

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL)

**Determinación de la bioactividad de fracciones peptídicas de
Agalychnis spurrelli y *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae)**

**Disertación previa a la obtención del título de
Licenciada en Ciencias Biológicas**

VALERIA LISETH CAJIAO GARCÉS

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Valeria Liseth Cajiao Garcés ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Miryan Rivera

Directora de la Disertación

Quito, 05 de noviembre del 2018

DEDICATORIA

*A mis padres, Marcia y Jaime; gracias por la paciencia y apoyo,
por ustedes esto fue posible.*

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y al Laboratorio de Investigaciones de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) por el financiamiento para el desarrollo de esta tesis, así como por las facilidades de infraestructura.

A la Magíster Miryan Rivera por su bienquisto apoyo que inició en el aula de clase y permanece en la actualidad. Gracias por su confianza, amabilidad y por tantos meritorios consejos.

A la Magíster Mercedes Rodríguez-Riglos y a la Magíster Isabel Ciprini por sus valiosas recomendaciones en la corrección de este manuscrito.

A la Máster Ailín Blasco por siempre estar presta a compartir su conocimiento, así como brindar un consejo y ayuda de la forma más desinteresada.

A la Máster Isabel Cipriani por sus enseñanzas y constante apoyo.

A la Máster Mercedes Rodríguez-Riglos, ya que, gracias a su proyecto, fue posible completar esta investigación.

A la división de herpetología de la PUCE, especialmente al Doctor Andrés Merino por permitirme trabajar con los individuos de la Balsa de los Sapos, así como por permitirme el uso de las instalaciones.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la PUCE y a la Licenciada Carolina Castro, por su constante ayuda.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), por la nimia capacitación en el área de cultivo celular, así como por los análisis previos realizados.

A mis compañeros de laboratorio, quienes siempre fueron apoyo y ayuda.

A mis amigos; por cada anécdota y alegría compartida durante los años de la carrera y luego de ella.

A mi familia, por creer en mí.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	15
2. ABSTRACT	16
3. INTRODUCCIÓN	17
4. OBJETIVOS	23
4.1 GENERAL	23
4.2 ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 RECOLECCIÓN DE EJEMPLARES	24
5.2 OBTENCIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS	24
5.3 LIOFILIZACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS	25
5.4 COMBINACIÓN DE SECRECIONES PEPTÍDICAS	25
5.5 FRACCIONAMIENTO DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN (HPLC)	26
5.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC®	27
5.7 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS FRACCIONES BIOACTIVAS	28
5.8 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE <i>Agalychnis spurrelli</i> Y <i>Phyllomedusa tomopterna</i> SOBRE LA LÍNEA CELULAR A549	28
5.8.1 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS	29
5.8.2 CAMBIO DE MEDIO	29
5.8.3 PASE DE CÉLULAS	30
5.8.4 MEDIO DE CONGELACIÓN	31
5.8.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD ENZIMÁTICA	31
5.8.6 PRUEBA COLORIMÉTRICA MTT	33

5.9	PRUEBAS HEMOLÍTICAS	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1	RECOLECCIÓN DE EJEMPLARES	35
6.2	OBTENCIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS	37
6.3	LIOFILIZACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS	39
6.4	COMBINACIÓN DE SECRECIONES PEPTÍDICAS	40
6.5	FRACCIONAMIENTO DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN (HPLC)	41
6.6	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC®	44
6.7	DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS FRACCIONES BIOACTIVAS	47
6.8	DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE <i>Agalychnis spurrelli</i> Y <i>Phyllomedusa tomopterna</i> SOBRE LA LÍNEA CELULAR A549	49
	6.8.1 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS	50
	6.8.2 CAMBIO DE MEDIO	51
	6.8.3 PASE DE CÉLULAS	51
	6.8.4 CONGELACIÓN CELULAR	53
	6.8.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD ENZIMÁTICA	53
6.9	PRUEBAS HEMOLÍTICAS	58
7.	CONCLUSIONES	61
8.	RECOMENDACIONES	63
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
10.	FIGURAS	72
11.	TABLAS	117
12.	ANEXOS	131

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Agalychnis spurrelli* y mapa de distribución potencial.
- Figura 2.** *Phyllomedusa tomodon* y mapa de distribución potencial.
- Figura 3.** Células A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 4.** Células A549 ATCC® disgregadas con tripsina-EDTA.
- Figura 5.** Separación cromatográfica de *Agalychnis spurrelli*.
- Figura 6.** Separación cromatográfica de *Phyllomedusa tomodon*.
- Figura 7.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 1, se observa el total de las fracciones analizadas.
- Figura 8.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 1, se observa las fracciones activas.
- Figura 9.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 1, se observa el total de las fracciones analizadas.
- Figura 10.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 1, se observa las fracciones activas.
- Figura 11.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 2, se observa el total de las fracciones analizadas.
- Figura 12.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 2, se observa las fracciones activas.
- Figura 13.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 2, se observa el total de las fracciones analizadas.
- Figura 14.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 2, se observa las fracciones activas.

- Figura 15.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 3, se observa el total de las fracciones analizadas.
- Figura 16.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 3, se observa las fracciones activas.
- Figura 17.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 3, se observa el total de las fracciones analizadas.
- Figura 18.** Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 3, se observa las fracciones activas.
- Figura 19** Detección de la actividad bactericida o bacteriostática de las fracciones bioactivas sobre *Escherichia coli*.
- Figura 20.** Detección de la actividad bactericida o bacteriostática de las fracciones bioactivas sobre *Staphylococcus aureus*.
- Figura 21.** Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 1.
- Figura 22.** Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 2.
- Figura 23.** Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 3.
- Figura 24.** Curva de citotoxicidad, ensayo 3.
- Figura 25.** Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 4.
- Figura 26.** Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 4.
- Figura 27.** Curva de citotoxicidad, ensayo 4.
- Figura 28.** Actividad anticancerígena de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* mediante ensayos de citotoxicidad con MTT.

- Figura 29.** Células A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 30.** Efecto del BSA + ácido acético sobre las células A549 ATCC®.
- Figura 31.** Efecto del ácido acético al 10% sobre las células A549 ATCC®.
- Figura 32.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 3125 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 33.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 1562 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 34.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 390.625 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 35.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 195.31 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 36.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 97.66 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 37.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 48.83 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 38.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 24.41 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 39.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 12.21 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 40.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 6.10 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 41.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 3,05 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.

- Figura 42.** Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 1.53 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 43.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 6250 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 44.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 3125 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 45.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 1562 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 46.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 781.25 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 47.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 390.625 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 48.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 195.31 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 49.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 97.66 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 50.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 48.83 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 51.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 24.41 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 52.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 12.21 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.

- Figura 53.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 6.10 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 54.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 3.05 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 55.** Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 1.53 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.
- Figura 56.** Actividad anticancerígena de las fracciones peptídicas de *Phyllomedusa tomopterna* mediante ensayos de citotoxicidad con MTT.
- Figura 57.** Citotoxicidad de las fracciones de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC®, ensayo 5, se observa el total de las fracciones analizadas.
- Figura 58.** Citotoxicidad de las fracciones de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC®, ensayo 5, se observa las fracciones activas.
- Figura 59.** Curva de citotoxicidad, ensayo 5.
- Figura 60.** Grado de hemólisis de las fracciones de *Agalychnis spurrelli*.
- Figura 61.** Prueba hemolítica de las fracciones activas de *Agalychnis spurrelli*.
- Figura 62.** Porcentaje de hemólisis producida por las fracciones activas de *Agalychnis spurrelli*.
- Figura 63.** Grado de hemólisis de las fracciones de *Phyllomedusa tomopterna*.
- Figura 64.** Prueba hemolítica de las fracciones activas de *Phyllomedusa tomopterna*.
- Figura 65.** Porcentaje de hemólisis producida por las fracciones activas de *Agalychnis spurrelli*.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Lista de los individuos de *Agalychnis spurrelli* colectados en la provincia de Esmeraldas.
- Tabla 2.** Lista de los individuos analizados de *Phyllomedusa tomopterna* de la Balsa de los Sapos en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Tabla 3.** Lista de los individuos de *Agalychnis spurrelli* empleados en la muestra peptídica 1.
- Tabla 4.** Lista de los individuos de *Agalychnis spurrelli* empleados en la muestra peptídica 2.
- Tabla 5.** Lista de los individuos de *Phyllomedusa tomopterna* empleados en la muestra peptídica 3.
- Tabla 6.** Registro de las extracciones y liofilizaciones de las secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna*.
- Tabla 7.** Bioactividad de las fracciones peptídicas de la muestra 1 de *Agalychnis spurrelli* sobre cepas bacterianas ATCC®.
- Tabla 8.** Bioactividad de las fracciones peptídicas de la muestra 2 de *Agalychnis spurrelli* sobre cepas bacterianas ATCC®.
- Tabla 9.** Bioactividad de las fracciones peptídicas de la muestra 3 de *Phyllomedusa tomopterna* sobre cepas bacterianas ATCC®.
- Tabla 10.** Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*.
- Tabla 11.** Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*.

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Estimulador transcutáneo de anfibios (Transcutaneous Amphibian Stimulator -TAS).
- Anexo 2.** Método manual de extracción de las secreciones peptídicas o estimulación mecánica.
- Anexo 3.** Detalles del proceso de liofilización de las secreciones cutáneas.
- Anexo 4.** Representación gráfica de la cámara de Neubauer.
- Anexo 5.** Plan de placa empleado en los ensayos de citotoxicidad 1 y 2.
- Anexo 6.** Plan de placas empleado en el ensayo de citotoxicidad 3.
- Anexo 7.** Plan de placas empleado en el ensayo de citotoxicidad 4.
- Anexo 8.** Plan de placas empleado en el ensayo de citotoxicidad con fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna*, ensayo 5.
- Anexo 9.** Plan de placa de la prueba de hemólisis de las fracciones obtenidas de *Agalychnis spurrelli*.
- Anexo 10.** Plan de placa de la prueba de hemólisis de las fracciones obtenidas de *Phyllomedusa tomopterna*.
- Anexo 11.** Cromatograma de *Phyllomedusa tomopterna* al realizar una corrida con una columna defectuosa.

1. RESUMEN

El análisis de las secreciones cutáneas de anfibios ha causado gran interés dentro del mundo científico debido al valioso número de moléculas con potencial uso biomédico que exhiben. Estudios previos han demostrado que las secreciones cutáneas totales obtenidas de la piel de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos, a la vez que presentan acción citotóxica sobre células cancerígenas. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar “*in vitro*” la bioactividad de fracciones peptídicas, procedentes de la secreción cutánea total de estas dos especies de hílidos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC®, *Escherichia coli* ATCC®, y sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549 ATCC®. Se obtuvieron las fracciones mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Su actividad antimicrobiana se probó mediante la técnica de microdilución en caldo y la actividad anticancerígena se evaluó mediante la técnica colorimétrica con el 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se obtuvo un total de 75 fracciones, de las cuales 18 de *A. spurrelli* presentaron actividad bactericida contra *E. coli*, y 16 contra *S. aureus*. 19 fracciones de *P. tomopterna* tuvieron actividad bactericida contra *E. coli* y 13 contra *S. aureus*. Además, se evidenció que la concentración mínima en la que la secreción cutánea cruda de *A. spurrelli* mantiene la actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de pulmón A549, es de 195.31 µg/mL y de *P. tomopterna* es de 195.31 µg/mL. El número de fracciones de *P. tomopterna* con actividad citotóxica sobre la línea celular A549 es de 24. Las fracciones que presentaron actividad antimicrobiana y/o anticancerígena, tanto de *Agalychnis spurrelli* como de *Phyllomedusa tomopterna*, presentaron un mínimo efecto hemolítico. Por lo expuesto anteriormente se puede concluir que los péptidos contenidos en las fracciones que demostraron tener actividad antibacterial y/o anticancerígena de las especies de ranas aquí analizadas, son candidatos potenciales para el desarrollo de medicamentos alternativos que permitan el control de bacterias y de células cancerígenas, minimizando posibles efectos adversos.

Palabras clave: Anfibios, antibacteriano, anticancerígeno, secreciones cutáneas, fracciones.

2. ABSTRACT

The analysis of the skin secretions of amphibians has caused great interest in the scientific world due to the valuable number of molecules with potential biomedical use that they exhibit. Previous studies have shown that the total skin secretions obtained from the skin of *Agalychnis spurrelli* and *Phyllomedusa tomopterna* are able to inhibit the growth of microorganisms and cancer cells. Therefore, the objective of this work was to determinate "in vitro" the bioactivity of the peptide fractions derived from the total cutaneous secretion of two species of hylids on *Staphylococcus aureus* ATCC®, *Escherichia coli* ATCC®, and on the lung cancer cell line A549 ATCC®. The fractions were obtained by High Performance Liquid Chromatography. The antimicrobial activity was tested by the broth microdilution method and the anticancer activity was evaluated by the 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) colorimetric technique. A total of 75 fractions were obtained, of which 19 from *A. spurrelli*, showed bactericidal activity against *E. coli*, and 18 against *S. aureus*. 19 fractions of *P. tomopterna* showed bactericidal activity against *E. coli* and 13 against *S. aureus*. In addition, it was evidenced that the minimum concentration in which the cutaneous secretion of *A. spurrelli* maintains the cytotoxic activity against the lung cancer cell line A549 is 195.31 µg / mL and of *P. tomopterna* is 195.31 µg / mL. The number of fractions of *P. tomopterna* with cytotoxic activity on the A549 cell line is 24. The fractions that showed antimicrobial and / or anticancer activity, of *Agalychnis spurrelli* and *Phyllomedusa tomopterna*, have a minimal hemolytic effect. From the foregoing, it can be concluded that the peptides contained in the fractions that were shown to have antibacterial and / or anticancer activity of the amphibian species analyzed here are potential candidates for the development of alternative drugs that allow the control of bacteria and cells. carcinogenic, minimizing possible adverse effects.

Keywords: amphibians, skin secretions, fractions, antibacterial, anticancer.

3. INTRODUCCIÓN

Los anfibios han desarrollado diversos mecanismos de protección contra depredadores y patógenos. Uno de éstos consiste en la producción de secreciones cutáneas que forman parte de su inmunidad innata (Gomes et al., 2007; Rollins-Smith et al., 2002). Dichas secreciones no son exclusivamente útiles a los anfibios, sino que, además, podrían serlo para el ser humano al constituir posibles principios activos de medicinas antibióticas, anticancerígenas, antiparasitarias, entre otros. (Clarke, 1997; Erspamer, Erspamer, y Cei, 1986). Por tanto, la preservación de los anfibios como fuente de servicios ecosistémicos, debe ser un tema prioritario tanto para investigadores como para la comunidad en general (Bridges, Koprak, y Johnson, 2001; Carrillo y Pavajeau, 2008).

Los servicios ecosistémicos son aquellos componentes que aportan al bienestar humano. Se los divide en: servicios de regulación, servicios de soporte, servicios culturales y servicios de provisión (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Los servicios de regulación son los utilizados en el control de enfermedades, mantenimiento de la calidad de aire y en el control de inundaciones. Los servicios de soporte son aquellos que prestan los espacios para conservar la diversidad de plantas y animales, es decir, actúan como base de todos los servicios ecosistémicos. Finalmente, los beneficios no materiales son los servicios culturales. Los servicios de provisión son bienes materiales que se adquieren de los ecosistemas para su consumo directo o su comercialización; por ejemplo, agua dulce, alimentos, recursos medicinales, entre otros. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018.). Los anfibios, al producir en su piel compuestos con potencial uso biomédico, constituyen un importante recurso ecosistémico de provisión.

La piel cumple funciones importantes en la supervivencia de los anfibios tales como: excreción, control de temperatura, reproducción, camuflaje, respiración, regulación del agua, actividad anti-predatoria y juega un rol sustancial en la defensa contra patógenos (Clarke, 1997). La piel de los anfibios es propensa al crecimiento fúngico y bacteriano debido a la presencia de humedad y macromoléculas nutrientes, por lo que los individuos necesitan un sistema de defensa eficiente que actúe de inmediato en la superficie de la piel (Clarke, 1997; Harris et al., 2009).

Existen dos tipos de glándulas principales en la piel de los anfibios: las glándulas mucosas que se encargan de mantener la piel húmeda y las glándulas granulares que son las responsables de la síntesis y almacenamiento de una extensa gama de compuestos químicos de amplio espectro que brindan protección contra depredadores y contra infecciones bacterianas y fúngicas. La movilización de dichos compuestos es rápida para neutralizar la infección, ya que la activación de la respuesta inmune sistémica es lenta en comparación con la proliferación de los patógenos, (Papo y Shai, 2003; Rollins-Smith, King, Nielsen, Sonnevend, y Conlon, 2005). Entre los compuestos sintetizados por las glándulas granulares están las aminas biogénicas, alcaloides, bufadienólidos, tretadotoxinas y péptidos (Conlon, Mechkarska, Lukic, y Flatt, 2014; Duellman y Trueb, 1994; Simmaco, Mignogna, y Barra, 1998).

Ersperamer en 1986 expuso la diversidad cualitativa y cuantitativa de compuestos biológicamente activos en la piel de los anfibios con posibles aplicaciones médicas. Esto ha sido confirmado en estudios recientes donde se demuestra que las secreciones cutáneas presentan compuestos con actividad antibacteriana, antitumoral, antifúngica, antiinflamatoria, inmunomodulatoria, antiparasitaria, antiviral, antidiabética, pro y anti-inflamatoria (Caicedo, 2007; Chuang, 2012; Conlon, Mechkarska, Lukic, Flatt, 2014; Proaño, 2004; Vallejo, 2016; Wang y Wang, 2004), cuya presencia es cuantiosa especialmente en especies de los géneros *Agalychnis*, *Phyllomedusa* y *Xenopus* (Bevins y Zasloff, 1990; Wang, Zhou, Chen, Zhou, Wang y Shaw, 2015).

La búsqueda de compuestos bioactivos con potencial uso biomédico en las secreciones cutáneas de anfibios mediante el empleo de técnicas moleculares como clonación molecular, secuenciación por degradación de Edman, espectrometría de masas, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) y liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS), sumado a técnicas analíticas como la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés), han elucidado la presencia y diversidad de péptidos y otros compuestos, lo que representa un importante aporte a la ciencia y al desarrollo de nuevos medicamentos (He et al., 2007; Proaño-Bolaños et al., 2016).

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) con sus diferentes métodos de detección como UV o espectrometría de masas; es una técnica analítica que permite

separar y analizar compuestos presentes en una muestra, proporcionando información cuantitativa y cualitativa (Snyder, Kirkland y Dolan, 2010). Está formada por dos fases: la móvil y la estacionaria. La fase estacionaria contiene un material de empaque o sorbente que está contenido en la columna, y la fase móvil es una sustancia líquida que fluye a través de la columna (Sirard, 2012). Ésta es la técnica más utilizada en la actualidad, entre otras razones, por su aplicabilidad en la ciencia e industria para detectar sustancias como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, plaguicidas, antibióticos, entre otros (Skoog, Holler y Crouch, 2008).

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por parte de Fleming, se ha iniciado la búsqueda de compuestos de origen sintético o natural que sean útiles en el tratamiento contra patógenos. La OMS informó en el 2017 que los patógenos resistentes a antibióticos convencionales deben considerarse como prioritarios al momento de desarrollar nuevos medicamentos, en especial contra bacterias enterobacteriáceas gramnegativas (*Escherichia coli*, *Serratia*, *Klebsiella*, y *Proteus*), ya que éstas pueden provocar infecciones en la corriente sanguínea y neumonías que pueden resultar letales. El problema radica en que las bacterias gramnegativas tienen la capacidad de desarrollar resistencia antibiótica y transmitirla a través del material genético lo que permite a otras bacterias ser también farmacorresistentes, incluso a los carbapenémicos y a las cefalosporinas de tercera generación (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Como se mencionó, el tratamiento convencional contra infecciones bacterianas es la administración de antibióticos. La problemática de resistencia bacteriana inicia cuando hay abuso en la prescripción de antibióticos, inadecuado control de las infecciones en los hospitales y clínicas, tratamientos inconclusos por parte de los pacientes, uso excesivo de antibióticos en la cría de ganado o pesca y saneamiento deficiente. Todos estos factores están provocando resistencia a los antibióticos comunmente empleados. Por tal motivo se hace necesario y prioritario promover la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos que constituyan alternativas efectivas en el tratamiento de infecciones. La investigación deberá estar ligada a campañas para modificar comportamentalmente al humano respecto al uso y abuso de antibióticos, de lo contrario, la resistencia seguirá significando una grave amenaza y un costo hospitalario importante, incrementando la duración de las estancias hospitalarias y la mortalidad de los pacientes (Organización Mundial de la Salud, 2017a, 2017b).

En estudios realizados previamente con la secreción de la piel de anfibios de familias como Hylidae y Ranidae se evidenció la presencia de diversos compuestos como aminas, alcaloides y péptidos biológicamente activos que contribuyen en la protección contra patógenos por medio de interacciones de fuerzas electroestáticas. La búsqueda de estos compuestos ha permitido el descubrimiento de péptidos activos con gran variedad de actividad farmacológica como las bombesinas, taquiquininas, hormona liberadora de tirotropina (TRH), bradiquininas, caeruleínas, e incluso, péptidos opioides (Conlon et al., 2014; Oelkrug, Hartke, y Schubert, 2015; Simmaco et al., 1998; Z. Wang y Wang, 2004).

Los péptidos mayormente presentan carga neta positiva, tienen un tamaño de 9 aminoácidos a 100 aminoácidos; unos presentan estructura linear con potencial de formar estructuras anfipáticas tipo α -hélice u hoja plegada β y otros son cíclicos y pueden adoptar también las estructuras α -hélice, hoja plegada β o ambas, gracias a la presencia de enlaces disulfuro (Oelkrug, Hartke y Schbert, 2015; Papo y Shai, 2003).

Hasta la fecha se han realizado diversos ensayos que han demostrado la actividad de las secreciones cutáneas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Numerosas bacterias Gram positivas tienen una pared celular gruesa (alrededor de 20 a 80 nm) que está compuesta en su mayoría por mureína. Además está formada de otros polímeros como los ácidos teicoicos, polisacáridos y peptidoglicolípidos, los cuales se unen al peptidoglicano mediante enlaces covalentemente (Baron, 1996). Las bacterias Gram negativas presentan una pared más delgada que está compuesta por peptidoglicano y presentan una membrana externa con lipopolisacáridos aniónicos que se estabilizan mediante cationes divalentes, como Ca^{2+} y Mg^{2+} , los cuales pueden ser desplazados por los péptidos antimicrobianos catiónicos, permitiendo así el acceso a la membrana externa de las bacterias.

Por tal motivo, el uso de los péptidos antimicrobianos en el tratamiento de infecciones bacterianas, debe ser considerado como alternativa a los antibióticos administrados comúnmente, ya que las interacciones que se producen entre los péptidos y la membrana de los microorganismos disminuyen la probabilidad de resistencia bacteriana, convirtiéndose en un mecanismo rápido no específico (Oelkrug, Hartke, y Schubert, 2015).

Por otro lado, el incremento en la detección de enfermedades catastróficas como el cáncer demanda tratamientos radicales y altamente invasivos como cirugías, quimioterapias y radioterapias (Instituto Nacional del Cáncer, 2017). Se designa como cáncer al conjunto de enfermedades donde varias células del cuerpo empiezan un proceso de división anormal y se diseminan a los tejidos cercanos (National Cancer Institute, 2014). En un proceso de división celular normal las células exhiben procesos de crecimiento y de división regulados para formar células nuevas y reemplazar a aquellas que envejecen o sufren algún daño, consiguiendo que el cuerpo funcione de forma óptima (American Cancer Society, 2018). Por el contrario, las células cancerígenas presentan crecimiento descontrolado y no responden a las señales de alto, lo que provoca la formación de tumores. Además, el proceso de división continúa a pesar de que exista daño génico, dando origen a células hijas con inestabilidad génica con posibles anomalías cromosómicas y ADN con daños (Chakraborty y Rahman, 2012; Winship Cancer Institute, 2016).

Aunque en la actualidad existen tratamientos alternativos como la inmunoterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre, medicina de presión y terapia dirigida, en la mayoría de los casos los tratamientos más usados siguen siendo quimioterapia y radioterapia (Instituto Nacional del Cáncer, 2017). Es importante considerar que, aunque la efectividad de estos tratamientos es alta, pueden existir efectos secundarios desfavorables, a la vez que las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a los fármacos empleados y los pacientes pueden mostrar respuestas negativas a estos tratamientos (Díes López-Ayllón, 2013).

La causa más común de muerte por cáncer en el mundo es el pulmonar con 1.69 millones de casos reportados en el año 2015. Los tipos de cáncer de pulmón que se han detectado hasta la actualidad son el adenocarcinómico, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células grandes (Wong, Lao, Ho, Goggins, y Tse, 2017). Adicionalmente, en el año 2009 se realizó un análisis estadístico de la incidencia y muertes a causa del cáncer pulmonar en Estados Unidos de Norteamérica y se evidenció que este tipo de cáncer es el más común, en hombres y mujeres, ubicándose solamente por debajo del cáncer de próstata y cáncer mamario (Jemal et al., 2009).

El Ecuador no es la excepción, ya que, según datos de la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de pulmón presenta una incidencia del 9.3%, ubicándose en el tercer lugar, después del cáncer de estómago y el de próstata. En el año 2012 se produjeron 753 muertes a causa del cáncer de pulmón; 432 casos fueron reportados en hombres y 321 en mujeres (SOLCA, 2014).

La línea celular A549 fue aislada por Giard en 1972 a partir de un adenocarcinoma pulmonar de un hombre caucásico de 58 años y presenta células alveolares epiteliales escamosas adenocarcinómicas. Es una línea celular humana hipotriploide con un número cromosómico modal de 66, aproximadamente. *In vitro* crecen formando una monocapa adherente (A549 Cell Line Transfection Protocol Reagent Method, 2018; Morantes, Perdomo, Carrillo, & Aristizábal, 2013).

Las secreciones cutáneas de ciertos anfibios exhiben propiedades anticancerígenas, ya que, al ser catiónicas, interactúan con la membrana de las células malignas, la cual tiene una composición química alterada. Esta interacción estimula a los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) a seleccionar específicamente a estas células malignas para interactuar electrostáticamente con los componentes de la membrana y destruirlas (Oelkrug et al., 2015).

Se ha estudiado la actividad de las secreciones cutáneas sobre muestras cancerígenas hospitalarias y sobre líneas celulares comerciales (Chuang, 2012; Van Zoggel et al., 2012). Estudios *in vitro* a partir de péptidos extraídos de *Xenopus laevis* establecieron la mortalidad de células pequeñas de cáncer de pulmón en un 71% (Ohsaki, Gazdar, Chen, y Johnson, 1992). La búsqueda de nuevos tratamientos basados en el descubrimiento de compuestos naturales con actividad antitumoral es necesaria e indispensable, ya que probablemente resulte en un tratamiento con menor toxicidad y efectos secundarios mínimos en comparación con aquellos fármacos sintetizados industrialmente y que son ampliamente usados (Xu y Lai, 2015).

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Determinar la bioactividad de fracciones peptídicas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae).

4.2 ESPECÍFICOS

- Detectar la actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas provenientes de la piel de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* sobre cepas bacterianas ATCC® de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar la citotoxicidad de la secreción cutánea total y/o de las fracciones peptídicas de *A. spurrelli* y *P. tomopterna* que presenten actividad sobre la línea celular ATCC® de cáncer de pulmón A549.
- Determinar el grado de hemólisis de las fracciones peptídicas que presenten actividad antimicrobiana y/o anticancerígena.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 RECOLECCIÓN DE EJEMPLARES

Con el fin de coleccionar a los ejemplares de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Figuras 1 y 2), se realizaron salidas al campo en las provincias de Esmeraldas y Pastaza, bajo el proyecto titulado “Evaluación de la actividad anticancerígena de las fracciones peptídicas provenientes de la secreción cutánea de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae) y su caracterización citogenética” del Laboratorio de Investigación de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

5.2 OBTENCIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS

Para la obtención de las secreciones cutáneas de los anuros en estudio se utilizó un estimulador transcutáneo de anfibios (TAS, por sus siglas en inglés) el cual fue modificado por Grant y Land en el 2002 (ver Anexo 1). Se aplicaron leves estímulos eléctricos intermitentes de entre 4 y 6 voltios, dependiendo el tamaño de la rana, en el dorso de cada una de ellas durante un (1) minuto. Enseguida se procedió a lavar a la rana con 10 mL de agua Milli-Q durante tres (3) minutos para coleccionar las secreciones expulsadas en cajas Petri de vidrio. Las cajas Petri se sellaron con papel Parafilm y se refrigeraron a -20° C. Los lavados a la rana se realizaron con ayuda de una pipeta y puntas estériles.

Además, como proceso alternativo de obtención de secreciones cutáneas al descrito anteriormente, se siguió el protocolo de Clark (2009) y se obtuvieron secreciones cutáneas mediante masajes (estimulación mecánica) (ver Anexo 2) en las glándulas parótidas y en las glándulas prominentes de las tibias, las cuáles son notorias en individuos de la subfamilia Phyllomedusinae. Los individuos analizados de las especies *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* se detallan en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

5.3 LIOFILIZACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS

Se colocaron las cajas Petri con las secreciones cutáneas de los anfibios en el equipo Liofilizador Virtis Advantage Plus, se inició el programa y se seleccionó la receta 6, la cual fue optimizada para la liofilización de soluciones acuosas de secreciones cutáneas de anfibios. Esta receta consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria.

En el Anexo 3 se muestra a detalle el proceso de liofilización, donde se indica los valores de temperatura en °C (Temp.), tiempo de duración de cada una de las fases (Time), en minutos. Además, si la temperatura es constante (H, Hold) o si es en gradiente (R, Ramp), la temperatura inicial (Freeze), tiempo de congelación adicional (Extra Freeze), la temperatura del condensador para habilitar el sistema de vacío (Condenser m.), el nivel de vacío requerido (Vacuum), secado secundario (Post Ht) y la temperatura de inicio (Secondary SP).

El proceso en total tuvo una duración de 16,5 horas. El liofilizado obtenido fue pesado, depositado en criotubos con la respectiva identificación y almacenado a -20 °C.

5.4 COMBINACIÓN DE SECRECIONES PEPTÍDICAS

Se procedió a homogeneizar las secreciones liofilizadas de los individuos en tubos estériles de 50 mL, asignando un tubo para cada especie. Cada uno fue rotulado con la fecha, especie, persona responsable y peso.

A las secreciones homogenizadas se las denominaron *mezclas*. Se realizaron en total 3 mezclas; las secreciones cutáneas liofilizadas empleadas en la mezcla 1 se detallan en la Tabla 3, las empleadas en la mezcla 2 se detallan en la Tabla 4 y las empleadas en la mezcla 3, se detallan en la Tabla 5.

5.5 FRACCIONAMIENTO DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN (HPLC)

El proceso de fraccionamiento de la secreción total de *A. spurrelli* y *P. tomopterna* se realizó en fase reversa con el equipo HPLC Binario Waters con inyector automático y detector UV/visible. El detector UV/visible es un dispositivo que reconoce y mide los eluyentes cuando salen de la columna, lo cual se refleja en los cromatogramas obtenidos (Snyder et al., 2010).

Se aplicó un gradiente lineal de acetonitrilo/ácido trifluoroacético y se empleó una columna semipreparativa C18. La columna tiene una fase BEH C18, de dimensiones 2,1 x 50 mm., el tamaño de partícula es de 1,7 μm , trabaja a temperatura ambiente y emplea como solvente al acetonitrilo. El tipo de separación de la fase móvil fue gradiente, con flujo de 0,2 mL/minuto y con volumen de inyección de 1 μL /minuto.

Las fases móviles se degasificaron mediante ultrasonido, se realizó la purga externa de las bombas y la purga interna del sistema cromatográfico con agua desionizada grado de calidad HPLC. Se empleó acetonitrilo con un flujo máximo de 2 mL/min y se acondicionó la columna con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.10%, con flujo de 2 mL/min., durante 40 minutos. La solución se preparó en una campana de extracción debido a las características tóxicas y volátiles del ácido.

Se pesaron 15 mg de liofilizado y se disolvió en 1,5 mL de ácido trifluoroacético al 0.10%. La solución obtenida se colocó en una jeringa desechable con filtro de membrana de 0,22 μm y se depositó el contenido en viales para HPLC. Se colocó el vial en el plato del inyector automático y la muestra se inyectó de manera automática en un volumen de 1000 μL . La solución empleada para el fraccionamiento de la secreción cutánea fue TFA al 0.10% + acetonitrilo 100%. El gradiente empleado para la separación cromatográfica inició con el 100 % de TFA, el cual es altamente polar y el 0% de acetonitrilo, mismo que es menos polar. Al final de la separación cromatográfica el gradiente fue de 0% de TFA y 100% de acetonitrilo.

Se obtuvieron las fracciones en tubos de vidrio previamente rotulados y enumerados del 1 al 75. Este proceso se realizó con ayuda del colector Waters Fraction Collector III acoplado al detector del HPLC. Las fracciones obtenidas eran incoloras, líquidas y con olor característico a acetonitrilo y TFA, debido a los solventes empleados. Cada fracción fue identificada, en orden ascendente, de acuerdo con el orden de colección; proceso que se realizó con el equipo Waters Fraction Collector III.

Los solventes (acetonitrilo y ácido trifluoroacético) fueron retirados con ayuda del concentrador de fracciones, mismo que está compuesto de una bomba de vacío OFP400, una trampa de vapor refrigerada RVT 5105 y el Concentrador al vacío SpeedVac SPD111V.

5.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC®

Para examinar el efecto de las fracciones peptídicas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC® y *Staphylococcus aureus* ATCC®, se sembraron 90 µL de la bacteria y 10 µL de cada fracción en las placas de microdilución.

Se incubaron las placas a 37 °C durante 24 horas (Incubadora Shell Lab, modelo 1525, código MRI_LICBA_302c_Incubadora_02). Completado el tiempo de incubación se midió la absorbancia resultante en un lector de absorbancia de microplacas marca Biorad a una longitud de onda de 630 nm.

Los controles empleados fueron tres: para el primero se pusieron 90 µL de bacteria y 10 µL solvente, para el segundo control se pusieron 100 µL de bacteria y en el tercer control se pusieron 90 µL de medio y 10 µL de solvente. El solvente que se empleó para las fracciones se elaboró con 0,2% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,01% de ácido acético (CH₃COOH) y se aforó a 10 mL de agua Milli-Q. Se añadieron 40 µL de este solvente a cada una de las fracciones a analizar y se pasó el contenido a tubos de 2 mL con ayuda de pipetas Pasteur autoclavadas de vidrio.

Se realizaron tres ensayos sobre *E. coli* y *S. aureus*; en el primer ensayo se examinó la muestra 1 de *A. spurrelli* (Tabla 3), en el segundo ensayo se empleó la muestra 2 de *A. spurrelli* (Tabla 4) y en el tercer ensayo se empleó la muestra 3 (Tabla 5), que contenía secreciones cutáneas de *P. tomopterna*.

Con cada fracción se realizaron 3 repeticiones técnicas. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA de una vía junto con la prueba de Dunnet para evaluar si existe una diferencia significativa entre los grupos. Esto se realizó en el programa estadístico GraphPad Prism 6.

5.7 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS FRACCIONES BIOACTIVAS

Se detectó la actividad bactericida o bacteriostática de fracciones que mostraron ser bioactivas en los ensayos contra las cepas bacterianas. Para ello, luego de la incubación de las placas de microdilución con los respectivos tratamientos y de los análisis estadísticos correspondientes, se identificaron los pocillos que mostraron bioactividad. Se tomaron 5 µL de cada uno de los pocillos que mostraron inhibición al crecimiento bacteriano y se sembró sobre un medio sólido enriquecido (Müller Hinton Agar), se incubó a 37°C durante 18 horas y transcurrido este tiempo se analizaron y se fotografiaron los resultados.

5.8 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Agalychnis spurrelli* Y *Phyllomedusa tomopterna* SOBRE LA LÍNEA CELULAR A549

Para determinar el efecto de las secreciones cutáneas totales de las especies *A. spurrelli* y *P. tomopterna*, así como de las fracciones de *P. tomopterna* sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549 ATCC® (Figura 3) se realizó el mantenimiento correspondiente de las células según lo mencionado por Giard, et al., 1973.

5.8.1 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Se llevó a baño María el medio de cultivo de las células A549 ATCC® y se expuso a luz UV el material necesario para el proceso de descongelación de células. Se tomaron 7 mL del medio de cultivo específico para células A549 ATCC® y se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL y otros 4 mL del medio en un flask de 25 mL (F25).

Se descongeló aproximadamente un 50% el criotubo que contenía a las células cancerígenas A549 y en la cabina de bioseguridad se pasó el contenido del criotubo al tubo Falcon que contenía 15 mL de medio de cultivo, se centrifugó durante 7 minutos a 1000 r.p.m. a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL del medio de cultivo para células A549 ATCC®. Se tomó el contenido y se pasó al frasco específico para cultivo celular F25 y se incubó a 37°C con CO₂ al 5%. El medio de cultivo de las células A549 contiene 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina y 39% F12-K, para un total de 50 mL (ATCC, 2014; Thermo Fisher Scientific, 2016).

Si el crecimiento celular es mínimo se puede añadir Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) en la misma proporción que el F12-K, con el fin de proveer a las células de más nutrientes y que estas se dividan a una velocidad normal.

5.8.2 CAMBIO DE MEDIO

Transcurridas las 24 horas se revisaron los flask con la línea celular en el microscopio de inversión y se realizó el cambio de medio. Para esto se realizaron 3 lavados, cada uno con 1,5 mL de PBS, se desechó el contenido y se colocó el medio de células A549 ATCC® en el flask con células (ATCC, 2014; Thermo Fisher Scientific, 2016). La revisión de los flask y el cambio de medio de éstos se realizó cada dos días con el fin de mantener a las células libres de contaminación.

5.8.3 PASE DE CÉLULAS

Se visualizó en el microscopio invertido si las células A549 ATCC® se encontraban en la confluencia idónea para realizar el pase celular (90-95% de confluencia) (Figura 3). Cuando se comprobó la confluencia celular se procedió con los lavados con PBS 1X (1,5 mL de PBS 1X en el flask de 25 cm³ y 3 mL el flask de 75 cm³), se comprobó que en cada lavado el PBS 1X cubrió las células, se retiró el PBS 1X y se repitió este proceso tres veces para retirar la mayor cantidad de células muertas, así como los desechos del metabolismo propio de las células (Miltenyi Biotec et al., 2010).

Se calentó la tripsina EDTA durante dos (2) minutos en el Baño María y se colocó 1 mL en el flask. Se comprobó que la tripsina cubría toda la superficie del flask y se incubó durante 5 minutos a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se verificó con ayuda del microscopio invertido que las células fueron disgregadas (Figura 4). Inmediatamente se añadió 1 mL de suero bovino fetal al flask para inhibir la función de la tripsina y evitar daños en las células. El contenido se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 7 minutos. Se retiró el sobrenadante del tubo Falcon y se colocó 1 mL del medio de cultivo para resuspender el pellet. Finalmente, para determinar qué volumen de células debe ser colocado en cada uno de los flask, se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer, para lo cual se homogenizaron 10 µL de células + 10 µL de azul de Tripán (Anexo 4). El orden de conteo es en zigzag: la primera fila de subcuadrados se contó de izquierda a derecha, la segunda fila se contó de derecha a izquierda y así sucesivamente, adicionalmente se tomaron en cuenta a las células de los bordes superior e inferior de los cuadrados y subcuadrados y fueron excluidas las células que tocaban los bordes inferior y derecho (Lomonte, 2015).

Se calculó el número de células con la siguiente fórmula y tomando en cuenta que el número cercano a obtener es de 4 x 10⁶ células en los flask de 25 mL (u 8 x 10⁶ células en los flask de 75 mL). Esto es para poder dividir dicha cantidad en dos flask de 25 mL (2 x 10⁶ de células por flask de 25 mL) (ATCC®, 2014; Miltenyi Biotec et al., 2010; Thermo Fisher Scientific, 2016).

$$\frac{C}{mL} = \frac{\# \text{ células contadas} \times \text{Factor de Dilución} \times 10000}{\# \text{ cuadrantes contados}}$$

5.8.4 MEDIO DE CONGELACIÓN

Cuando se contó con el número de células A549 ATCC® suficientes, se iniciaron los ensayos citotóxicos o se realizó pasaje celular para incrementar el stock de células o se procedió a congelar.

Para almacenar las células durante un tiempo indefinido, se procedió al proceso de congelación. Para iniciar con este proceso se calentó a Baño María el medio de las células, el PBS 1X, el suero bovino fetal y la tripsina. El proceso es similar al de pasaje celular, pero en lugar de sembrar nuevamente las células en los flask, se las colocaron en criotubos junto con el respectivo medio de congelación. El medio de congelación está formado por 800 µL de Suero Bovino Fetal (SBF) + 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) + 100 µL de células; (SBF y DMSO en proporción 8:1).

El contenido se mezcló por inversión, evitando que se formen burbujas que puedan interferir con la adecuada congelación de las células. El proceso de congelación celular fue escalonado, es decir, se colocaron los criotubos a -20 °C durante 4 horas y luego se transfirieron a una ultracongeladora a -150 °C o a un tanque de nitrógeno según la disponibilidad.

5.8.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD ENZIMÁTICA

Debido a que no se han realizado estudios previos que determinen el efecto citotóxico de la secreción peptídica total de las especies *A. spurrelli* y *P. tomopterna* sobre la línea celular cancerígena pulmonar A549 ATCC®, se procedió a realizar ensayos con la secreción total de estos anfibios y posteriormente se realizaron los ensayos con las fracciones obtenidas a partir de la secreción cutánea total de *P. tomopterna*.

Los ensayos realizados fueron:

- Dos ensayos con la secreción total de las especies *A. spurrelli* a las concentraciones: 50 µg/mL 25 µg/mL y 12.5 µg/mL; y con la especie *P. tomopterna* a las concentraciones: 100 µg/mL, 50 µg/mL y 25 µg/mL, para

determinar si existe efecto anticancerígeno de estas secreciones. El plan de placa se detalla en el Anexo 5.

– Un tercer ensayo para determinar la concentración máxima que evidencia la actividad anticancerígena de *A. spurrelli* a las concentraciones: 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL y 1.562 mg/mL y con la secreción total de *P. tomopterna* a las concentraciones: 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/ μ L y 3.125 mg/ mL. El plan de placa se detalla en el Anexo 6.

– Un cuarto ensayo para determinar la concentración mínima que mantiene la actividad anticancerígena de *A. spurrelli* mediante diluciones seriadas a partir de 3125 μ g/ μ L hasta 1.53 μ g/ μ L. y de *P. tomopterna* a partir de 6250 μ g/ μ L hasta 1.53 μ g/ μ L. El plan de placa se detalla en el Anexo 7.

– Un quinto ensayo para determinar la actividad anticancerígena de las fracciones derivadas de la secreción cutánea total de *P. tomopterna*. El plan de placa se detalla en el Anexo 8.

Cabe mencionar que los dos primeros ensayos de citotoxicidad con la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* se realizaron en el Departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Superior Politécnica del Ecuador (ESPE), bajo la dirección de la Dra. Marbel Torres y los siguientes ensayos con la secreción total, así como con las fracciones recuperadas, se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Citogenética y Biomoléculas de Anfibios (LICBA), perteneciente al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, bajo la dirección de la Mtr. Miryan Rivera I. El ensayo de citotoxicidad con las fracciones peptídicas se realizó únicamente con las fracciones de *P. tomopterna*.

Para iniciar el ensayo con la secreción total se verificó que la confluencia celular fue del 90% al 95%. Se realizó el proceso de disgregación celular con el uso de tripsina-EDTA y se realizó el conteo celular con la cámara de Neubauer. En la placa de microdilución se colocaron 198 μ L de medio + 2 μ L de células (aproximadamente 10000

células) en cada pocillo. Se incubó la placa con células durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂ para permitir la adherencia de las células, así como la confluencia requerida en cada pocillo para iniciar el ensayo.

Transcurridas las 24 horas de incubación se realizó el cambio de medio de la placa de 96 pocillos, se añadieron 100 µL de las concentraciones de la secreción peptídica a analizar y se incubó nuevamente durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

5.8.6 PRUEBA COLORIMÉTRICA MTT

Después de incubar la placa durante 24 horas, se realizó la prueba colorimétrica MTT en base a las recomendaciones de Thermo Fisher Scientific (2002), para lo cual se añadieron 10 µL del reactivo MTT a cada pocillo de la placa de cultivo celular y se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron 90 µL de cada pocillo y se añadieron 100 µL de DMSO a cada pocillo, procurando su homogenización con el fin de liberar el colorante azul o morado oscuro empleado en la técnica colorimétrica MTT. Se incubó la placa durante 10 minutos adicionales a 37 °C y 5% de CO₂, esto provocó la liberación total del colorante de las células. Se midió la absorbancia a 550 nm.

5.9 PRUEBAS HEMOLÍTICAS

Los análisis hemolíticos se basaron en el protocolo establecido por Asoodeh, Sepahi y Ghorani-Azam (2014). Para proceder con los ensayos se colocaron 2 mL de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus* en un tubo cónico y se centrifugaron a 1000 r.p.m. durante cinco (5) minutos, se descartó el sobrenadante y se añadieron 5 mL de PBS 1X, se mezcló suavemente por rotación.

Se centrifugó el tubo cónico nuevamente a 1000 r.p.m. durante 5 minutos adicionales, se repitieron los lavados hasta que se obtuvo un sobrenadante limpio y se mezcló 1 mL de eritrocitos con 19 mL de PBS para preparar una solución al 5%.

Se diluyeron las fracciones en un volumen de 220 μ L de PBS estéril. En un tubo de 1.5 mL se añadieron 70 μ L de la solución de la fracción peptídica más la solución de eritrocitos al 5% y se realizaron tres réplicas técnicas por fracción, se centrifugaron los tubos a 1000 r.p.m. durante 5 minutos, se transfirieron 70 μ L de cada sobrenadante a la placa de 96 pocillos.

Se incubaron las placas a 37 °C durante 120 minutos y transcurrido el tiempo de incubación se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm o 550 nm, mediante un espectrofotómetro (iMark Bio Rad) a las 0 horas y se calculó el porcentaje de hemólisis considerando como el control + de hemólisis representa el 100% de la actividad hemolítica posible.

El plan de placa empleado para analizar el efecto hemolítico de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* se observa en el Anexos 9 y de *Phyllomedusa tomopterna*, en el Anexo 10.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RECOLECCIÓN DE EJEMPLARES

Los individuos identificados como *Agalychnis spurrelli* fueron colectados en la provincia de Esmeraldas, en la localidad de Durango, en las coordenadas 1,03692, -78,62677, a los 192 m.s.n.m., en un bosque de tierra firme, en una poza junto a la carretera. En total se colectaron treinta individuos de *A. spurrelli* (Tabla 4),

Los individuos identificados como *Phyllomedusa tomopterna* fueron colectados en la provincia de Esmeraldas, en la localidad de San Lorenzo, en la latitud 1,2218 y longitud -78,636, a los 156 m.s.n.m. Los individuos son mantenidos en la Balsa de los Sapos y en el bioterio de CISEAL de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los anfibios son mantenidos en terrarios humedecidos e identificados con el número de terrario T3779 y su alimentación se basa estrictamente en grillos. Además se colectaron individuos de esta misma especie en la provincia de Morona Santiago, en el poblado Jempekat, en las coordenadas: latitud S 02,98535 y longitud W 77,80674, a los 275 m.s.n.m. Finalmente se colectaron otros individuos de *P. tomopterna* en la provincia de Morona Santiago, en las coordenadas: latitud 2,97554 y longitud 77,80346, a los 622 m.s.n.m. (Tabla 5).

Es necesario tomar en cuenta que las condiciones básicas que requieren éstos anfibios para vivir en cautiverio son: disponibilidad de agua, terrarios adecuados, condiciones ambientales óptimas de luz, humedad, temperatura y alimentación (Schad, 2008). En cautiverio se replica la mayoría de estas condiciones a fin de reducir el estrés de los anfibios y a la vez minimizar el porcentaje de mortalidad de los especímenes.

Adicionalmente existen otras variantes de los factores ambientales antes citados, que en algunas ocasiones, pueden ser subestimados como la calidad y la cantidad de luz (Peloso, Orrico, Haddad, Lima-Filho, y Sturaro, 2016; Schad, 2008). En la naturaleza los individuos pasan gran parte del día expuestos al sol para poder sintetizar correctamente la vitamina D3 a partir de la vitamina D2 (Kim, Chung, y Kim, 2011). La vitamina D3 es fundamental para la adecuada absorción de calcio, el cual es usado en la construcción y el

fortalecimiento del sistema óseo (Laird, Ward, McSorley, Strain, y Wallace, 2010). Por tanto, se evidencia el papel primordial que la luz juega en la conservación adecuada de los especímenes mantenidos en cautiverio.

Como parte de los cuidados *ex situ* que se plantearon para el mantenimiento de los individuos durante este trabajo de investigación y posterior a éste, se optó por la exposición de los anfibios a la luz solar con periodicidad semanal para que eviten problemas en la absorción de calcio y por tanto de su sistema óseo (Kim, Chung y Kim, 2011; Schad, 2008). Si no fuese posible exponer a los individuos en cautiverio a la luz solar se puede optar por la luz artificial, la cual tiene menos beneficios en comparación con la luz natural. En este caso, los individuos deben estar a una distancia prudente de las lámparas de luz para evitar quemaduras, pero al mismo tiempo deben estar lo suficientemente cerca para que la luz artificial sea eficaz (Schad, 2008).

Tal como se mencionó anteriormente, otro de los factores decisivos en el cuidado de los individuos es la alimentación. La dieta suministrada fue únicamente a base de grillos, *Acheta domestica*, que fueron proporcionados por la Balsa de los Sapos, entidad en la que el proceso de crianza ya está estandarizado y en donde se cuenta con variedad de tamaños.

Para alimentar a las ranas se consideró el tamaño de su boca y así seleccionar el tamaño de grillo adecuado, ya que, si son demasiado grandes para el anfibio, no son consumidos o pueden causar una ruptura del tracto digestivo. Es primordial considerar esto porque los problemas de nutrición pueden desencadenar en problemas metabólicos, de desarrollo, reproductivos e incluso la muerte. Además, la alimentación debe ser balanceada entre lípidos, calcio y fósforo, por lo que se recomienda alternar la dieta con otros insectos como moscas de la fruta, tenebrios, cucarachas y lombrices de tierra. Estos últimos son fuente rica en proteínas y lípidos, por lo que son idóneos en anfibios desnutridos ya que tienen una mejor proporción entre el calcio y el fósforo que cualquier otro invertebrado que es usado como alimento vivo (Schad, 2008).

El tamaño de grillo que resultó conveniente para los individuos *Agalychnis saltator* y *Phyllomedusa tomopterna* de este estudio fue del tipo 4, los cuales miden alrededor de 3 cm. Los grillos fueron espolvoreados con calcio para suplir la demanda de

este mineral y así minimizar problemas de nutrición y reducir la tasa de mortalidad de los individuos.

6.2 OBTENCIÓN DE SECRECIONES CUTÁNEAS

El procedimiento estándar para la obtención de las secreciones cutáneas de las ranas se basa en una leve estimulación eléctrica; sin embargo, al pesar las secreciones liofilizadas, resultó interesante verificar que la obtención de las mismas puede lograrse incluso con una simple estimulación mecánica, mediante un masaje en las glándulas granulares las cuales están presentes en el dorso de los individuos, que es dónde las secreciones se producen, almacenan y se liberan (Bevins y Zasloff, 1990).

Las secreciones cutáneas obtenidas tuvieron un olor característico, fueron transparentes y algo viscosas y se observaron diferencias entre las secreciones cutáneas de los individuos de *A. spurrelli* y *P. tomopterna*. Por un lado, las secreciones de los individuos del género *Phyllomedusa* se observaron espesas, de olor característico y algo picante, mientras que las secreciones obtenidas del género *Agalychnis*, eran menos espesas, de olor similar a las leguminosas. El hecho que las secreciones de *Agalychnis spurrelli* fueron menos mucilaginosas puede deberse, probablemente, a que éstas eran más solubles en agua que las de *Phyllomedusa tomopterna*, debido a su polaridad, la cual las hace afines a las moléculas de agua. Las secreciones de *Agalychnis* y de otros géneros no son visualmente obvias pero una vez realizado el proceso de liofilización se puede observar una delgada capa de aspecto similar al algodón y mayormente de color blanquecino (Marenah et al., 2004).

La técnica de extracción mediante impulsos eléctricos es la más empleada actualmente porque es muy bien tolerada por el animal, el proceso de extracción toma menos minutos y la extracción puede ser repetida una vez que las glándulas se reaprovisionan luego de dos a tres semanas (Simmaco, Mignogna y Barra, 1998). El equipo empleado en la estimulación eléctrica, como se mencionó, fue el TAS (Anexo 1), el cual estimula eléctricamente a los anfibios e induce la liberación de las secreciones cutáneas. Este dispositivo fue desarrollado por Tyler y colaboradores y más tarde modificado por Grand y Land (Grant y Land, 2002; Tyler, Stone, y Bowie, 1992).

Los estímulos eléctricos que se aplicaron a los individuos fueron mínimos (4 voltios máximo), ya que solo se necesitó un estímulo mínimo para estresar al animal y poder coleccionar las secreciones cutáneas. Es importante mencionar que los estímulos deben ser aplicados intermitentemente en el dorso de los anfibios y de acuerdo al tamaño del individuo, puesto que una sobre estimulación eléctrica puede resultar dañino e incluso letal para los anfibios (Clark y Clark, 2009).

Se debe considerar que en la literatura se mencionan técnicas químicas de extracción. Por ejemplo, a partir de extractos metanoicos de pieles secadas al sol, donde la problemática se centra en que no se detecta actividad antimicrobiana significativa, posiblemente como resultado de una mala recuperación de los péptidos en metanol o debido a una degradación proteolítica durante el procedimiento de secado, actualmente se opta por realizar modificaciones que consisten en la homogenización de la piel fresca en acetato de sodio, a un pH 4 y en presencia de inhibidores de proteasas, o en su defecto, extracciones a partir de la piel seca con ácido acético al 10% y a temperatura ambiente (Simmaco, Mignona y Barra, 1998). Obviamente, esto implica sacrificar a los individuos, lo cual limita el número de extracciones. Este procedimiento podría justificarse cuando se produzca la muerte espontánea de los especímenes.

La temperatura de almacenamiento de las secreciones obtenidas y de las secreciones liofilizadas fue de -20 °C, lo que concuerda con lo mencionado en la literatura, donde se indica que éstas deben ser almacenadas en congelación en un rango de temperatura entre los -20 °C y -80 °C (Clarke, 1997). Además, Clark menciona que se puede añadir 1 mL de ácido acético o ácido fórmico al 1% por cada 9 mL de secreción contenida en agua en caso de que las muestras no puedan ser congeladas o liofilizadas inmediatamente, por lo que deben permanecer a temperatura ambiente. Ésta es una medida para evitar contaminaciones causadas principalmente por microorganismos ambientales, ya que el ácido va a inhibir el crecimiento de bacterias (Clark, 2009). Durante este ensayo no fue necesario añadir ningún tipo de ácido porque siempre fue factible refrigerar o incluso liofilizar las muestras inmediatamente.

En lo que respecta a la recolección de las secreciones cutáneas obtenidas, éstas se coleccionaron en cajas Petri de vidrio que fueron selladas con papel Parafilm, lo que coincide

con la bibliografía donde se indica que es una de las mejores opciones de almacenamiento a pesar de la fragilidad de las cajas.

Además, hay que considerar que el envase para almacenar dependerá del propósito del estudio; por ejemplo, si el objetivo del estudio es el análisis químico de las secreciones, es imperativo evitar contaminaciones de cualquier tipo que puedan interferir con los resultados. En este caso los viales de vidrio con tapas roscas revestidas de teflón o tubos de propileno son la mejor opción porque no son fuente de contaminación aunque pueden presentar pequeñas fugas a pesar de que estén sellados con papel Parafilm. Los tubos con tapas revestidas de goma, si bien no presentan fugas de su contenido, no deben ser usadas en análisis químicos, ya que los revestimientos de goma pueden liberar moléculas pequeñas en las muestras, provocando contaminaciones (Daly et al., 2008).

6.3 LIOFILIZACIÓN DE MUESTRAS OBTENIDAS

El proceso de liofilización es fundamental para el adecuado mantenimiento de las secreciones cutáneas de los anfibios porque en ellas están presentes moléculas peptídicas susceptibles a desnaturalización. La liofilización es un proceso de desecación donde el agua contenida en una muestra se congela y se elimina mediante sublimación en una cámara de vacío (Guidolquim, 2014). Si la liofilización se realiza adecuadamente, la eliminación del agua de la muestra no produce cambios en la estructura de la molécula, lo cual resulta clave puesto que la funcionalidad de las moléculas peptídicas presentes en las secreciones cutáneas de los anfibios depende de que su estructura secundaria no se pierda; es decir, que los péptidos no se desnaturalicen.

Las secreciones cutáneas liofilizadas se almacenaron a -20 °C en criotubos sellados con papel Parafilm. Los pesos de las secreciones cutáneas liofilizadas tanto de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* se detallan en la Tabla 6.

Como se mencionó, la temperatura de almacenamiento fue de -20 °C, la cual está dentro del rango sugerido para evitar desnaturalización de las moléculas (-20 °C a -80 °C), además, las secreciones liofilizadas deben estar protegidas de la luz intensa (Clark, 2009),

a diferencia de los péptidos sintéticos que pueden estar a temperatura ambiente y mantener la estabilidad de las moléculas (Smart Bioscience, 2016).

6.4 COMBINACIÓN DE SECRECIONES PEPTÍDICAS

Es necesario tomar en cuenta que uno de los limitantes en este tipo de investigación es la cantidad de la secreción cutánea obtenida por cada uno de los especímenes, por lo tanto, para minimizar posibles desperdicios del material y contar con la cantidad de muestra necesaria, se optó por combinar las muestras de todos los individuos representantes de cada especie, siempre y cuando se compruebe, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, que los componentes de la secreción cutánea total de cada uno de los especímenes analizados sea similar. En efecto, luego de realizar las correspondientes cromatografías se pudo constatar que el perfil cromatográfico fue similar entre los individuos de cada una de las especies, por lo que se procedió a combinar las secreciones cutáneas en tubos de 50mL.

Otro aspecto positivo de homogenizar las secreciones de las especies, y con ello incrementar la cantidad de la muestra, es que, una vez probada la actividad de cada una de las fracciones, el siguiente paso es la purificación de las moléculas responsables de la o las bioactividades detectadas, que debe hacerse a partir de la muestra original de la cual se hicieron las respectivas pruebas.

Al producto resultante de la homogenización de los liofilizados obtenidos se los denominó *muestras*; de *A. spurrelli* se obtuvieron dos muestras: muestra 1 y 2. La muestra 1 fue usada como prueba para analizar la repetibilidad de los cromatogramas al homogenizar secreciones cutáneas de diferentes individuos, ya que, si bien se confirmó la repetibilidad entre individuos, se quiso analizar también la bioactividad presente.

Así, al homogeneizar la primera muestra se obtuvieron 0.011 g de péptido y al homogeneizar la segunda (la cual ya incluyó todas las secreciones peptídicas liofilizadas), se obtuvieron 0.3427 g. Al homogeneizar los liofilizados de la especie *P. tomopterna* en un tercer tubo de 50 mL se obtuvo la muestra 3 con un peso de 0.2535 g. Los individuos empleados en la muestra 1 se detallan en la Tabla 3, los individuos empleados en la

muestra 2 se detallan en la Tabla 4 y los individuos empleados en la muestra 3 se detallan en la Tabla 5.

En base a los resultados y cromatogramas obtenidos con la muestra 1, mismos que mostraron repetibilidad, se optó por homogenizar todas las secreciones disponibles de cada especie en estudio para disminuir las diferencias entre las corridas en el HPLC, además para optimizar el material disponible limitado y para lograr una combinación de secreciones cutáneas uniforme para los ensayos.

6.5 FRACCIONAMIENTO DE LAS SECRECIONES CUTÁNEAS TOTALES UTILIZANDO LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRECISIÓN (HPLC)

La Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) es una técnica analítica que permite separar los compuestos presentes en una mezcla que se basa en la interacción de éstos con un sistema de solventes conocido como fase móvil y con la fase estacionaria constituida por una columna de separación. Por este motivo, esta técnica fue idónea para separar las moléculas presentes en las secreciones cutáneas totales de los anfibios analizados, empleando como fases móviles al acetonitrilo y al ácido trifluoroacético.

Existen cromatografías líquidas de dos tipos: la de fase normal y la de fase reversa. Específicamente, se empleó la cromatografía de fase reversa, porque los analitos estudiados, al ser no polares y presentar características hidrofóbicas, deben ser separados mediante una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar, y de esta forma lograr una separación de los analitos hidrofóbicos, además la separación cromatográfica inicia con el solvente acuoso y termina con el solvente orgánico (Sirard, 2012). No es posible realizar el análisis de las secreciones peptídicas mediante la cromatografía de fase normal, puesto que ésta emplea una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, por lo cual no se lograría separar y analizar los analitos presentes en las muestras.

Considerando que en estudios previos se comprobó la actividad antibacteriana, antifúngica y anticancerígena de las secreciones cutáneas totales de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Chuang, 2012; Proaño, 2004), resulta imperativo detectar

aquellas moléculas responsables de esas bioactividades mediante el fraccionamiento de la secreción cutánea total a través de la técnica analítica antes mencionada (HPLC en fase reversa) (Masschelein-Kleiner, 2004). En este caso, se programó al equipo para obtener fracciones de la muestra cada minuto, durante 75 minutos a una longitud de onda de 214 nm. Esto permitió obtener cromatogramas con picos muy bien definidos, lo que posibilitó una adecuada detección de las moléculas presentes en las secreciones cutáneas totales.

Además, al analizar los respectivos cromatogramas, se evidenció la cantidad de compuestos presentes en las muestras peptídicas que resultaron característicos para cada una de las especies analizadas (Figuras 5, 6 y Anexo 11). Los picos que forman parte del cromatograma indican la presencia de uno o más compuestos (como por ejemplo péptidos o aminos) que se detectaron de acuerdo con la absorbancia a la cual el equipo se encuentra configurado, lo que no indica el cromatograma es la cantidad en que se encuentran cada uno de estos compuestos.

Para obtener una buena separación cromatográfica que no proyecte picos mal definidos, es necesario operar adecuadamente al equipo, lo cual incluye, por ejemplo, la adquisición de reactivos de pureza grado HPLC y un adecuado uso de la columna de separación a fin de evitar el desgaste o contaminación de ésta. Además se debe evitar la presencia de gases disueltos en la columna del sistema cromatográfico.

Pese a que los solventes grado HPLC son filtrados minuciosamente en la fábrica, es probable que estos puedan acumular residuos debido a la exposición de los solventes al polvo durante el envase del solvente. Además, puede producirse la formación de pequeños residuos originados por la condensación y polimerización de partículas del solvente. También puede existir contaminación del solvente al momento de abrir una nueva botella para el uso, porque los gases que se encuentran disueltos en la atmósfera pueden ingresar al interior del envase y contaminarlo.

En base a expuesto anteriormente, durante el uso del equipo HPLC, se tomó en cuenta esta problemática y se optó por filtrar y degasificar el ácido trifluoroacético antes de su uso, impidiendo que posibles partículas causen daños en la bomba HPLC o en la columna. Adicionalmente el método de filtración del solvente que se empleó fue al vacío y el de degasificación, con ultrasonido. Cabe mencionar que en la bibliografía se menciona

que también se puede desgasificar sustancias burbujeando helio (Sirard, 2012; Snyder, Kirkland y Dolan, 2010).

Otra consideración necesaria para mantener en óptimas condiciones a la columna y obtener un correcto fraccionamiento de la secreción cutánea total es tomar en cuenta la naturaleza de la secreción de cada especie; por ejemplo, las secreciones de *A. spurrelli* son menos viscosas que las de *P. tomopterna* por lo que el proceso de filtrado previo a la inyección de la muestra en el equipo HPLC fue menos complejo. *P. tomopterna*, por otro lado, exhibió secreciones más glutinosas, por lo que fue necesario llevar al vórtex y usar un mayor número de filtros para evitar que se inyecten partículas sólidas que podrían causar daños en el equipo.

La separación cromatográfica de *A. spurrelli* se puede observar en la Figura 5 , el cual muestra picos muy bien definidos como resultado de un adecuado manejo del equipo y de la calidad de la columna. Al realizar otras corridas con muestras de *A. spurrelli* se observó repetibilidad en los cromatogramas, lo que indica que las condiciones de funcionamiento del equipo HPLC son idóneas, y que la calidad de la muestra liofilizada fue la adecuada.

Por otro lado, las separaciones cromatográficas obtenidas de *P. tomopterna* se pueden observar en la Figura 6 y en el Anexo 11. En este caso se muestran dos cromatogramas; en el Anexo 11 se observa un cromatograma resultado de trabajar con una columna con desgaste y la evidencia es la proyección de los picos poco o nada definidos, mientras que en la Figura 6 se observa un cromatograma cuando se trabajó con una nueva columna, por lo que se muestran picos definidos. Con base a lo mencionado previamente, se evidencia la importancia de trabajar con una columna en adecuadas condiciones.

Una vez realizados los correspondientes procesos cromatográficos con las secreciones cutáneas totales de las dos especies analizadas, se recuperó un total de 75 fracciones con cada una de las cuales se procedió a verificar cuál o cuáles de ellas presentan actividad antibacteriana y/o anticancerígena.

6.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES PEPTÍDICAS SOBRE CEPAS BACTERIANAS ATCC®

De acuerdo a investigaciones previas realizadas en el LICBA, las secreciones cutáneas totales de *Agalychnis spurrelli* y de *Phyllomedusa tomopterna* exhiben actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas ATCC®, Gram + y Gram -, así como sobre bacterias multirresistentes a los antibióticos convencionales (Caicedo, 2007; Llumiquinga, 2017; Proaño, 2004; Vallejo, 2016). Es probable que este tipo de actividad se encuentre comandada por la presencia de péptidos antimicrobianos (AMPs).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son las moléculas efectoras del sistema inmune innato, que están presentes desde organismos simples como las bacterias hasta en organismos más complejos (Téllez y Castaño, 2010). El espectro de actividad de éstos es vasto, detectándose actividad contra hongos, parásitos, virus, bacterias y tumores, por lo que resulta interesante continuar con el análisis de los AMPs a fin de esclarecer aún más las posibles propiedades y aplicaciones biomédicas.

Con base a los reportes científicos previos de las secreciones cutáneas totales, se procedió a analizar las fracciones resultantes de la cromatografía líquida de alta eficacia, sobre las bacterias *E. coli* y *S. aureus* ATCC®, donde, después de realizar el análisis estadístico ANOVA de una vía y la prueba de Dunnet, se evidenciaron diferencias significativas entre al menos un tratamiento (fracción) y el control positivo de crecimiento (pocillo con bacterias), con lo que se comprobó la acción antimicrobiana de al menos una fracción en cada una de las combinaciones.

El número de fracciones efectivas obtenidas al ensayar la muestra 1 (*A. spurrelli*) sobre la bacteria *E. coli* fue de 18 fracciones; de estas, 15 presentaron actividad bactericida (33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 49) y 3 presentaron actividad bacteriostática (32, 44, 45), los resultados se detallan en las Figuras 7 y 8. La actividad de la muestra 1 (*A. spurrelli*) sobre la bacteria *S. aureus* fue de 16 fracciones; de éstas, 10 presentaron actividad bactericida (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 48 y 49) y 6 presentaron actividad bacteriostática (35, 46, 47, 50, 51, 52). Los resultados se observan en las Figuras 9 y 10.

Al emplear la muestra 2 de *A. spurrelli* sobre la bacteria *E. coli*, las fracciones activas fueron 17 (31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46; 47, 54 y 63). De éstas, 14 presentaron actividad bactericida (32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 46, 47, 54 y 63) y 3 presentaron actividad bacteriostática (31, 43 y 44), esto se observa en las Figuras 11 y 12. La actividad de la muestra 3 de *A. spurrelli* sobre la bacteria *S. aureus* fue de 13 fracciones (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 50); de éstas, 7 presentaron actividad bactericida (35, 46, 47, 50, 51, 52 y 53) y 3 presentaron actividad bacteriostática (31, 43 y 44), el detalle se encuentra en las Figuras 13 y 14.

Al analizar la actividad de la muestra 3 (*P. tomopterna*) sobre la bacteria *E. coli* se obtuvieron 19 fracciones activas (5, 20, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48 y 49); de éstas 15 presentaron actividad bactericida (5, 20, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 43, 46, 47 y 48) y 4 presentaron actividad bacteriostática (40, 41, 42 y 49). Los resultados se observan en las Figuras 15 y 16. La actividad de la muestra 3 (*P. tomopterna*) sobre la bacteria *S. aureus* fue de 13 fracciones (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48 y 49); de estas, 10 presentaron actividad bactericida (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 47, 48 y 49) y 4 presentaron actividad bacteriostática (42, 43, 46 y 49) (Figura 17 y 18).

En todos los casos analizados previamente, la mayoría de las fracciones efectivas fueron obtenidas en el último lapso de la separación cromatográfica, lo que da indicios de que éstas son menos polares, ya que, al ser la fase móvil menos polar (acetonitrilo), se espera que las últimas fracciones sean igualmente menos polares que las obtenidas al inicio del ensayo.

La significancia obtenida mediante la prueba de Dunnet advierte que, en todos los casos donde se obtuvieron fracciones activas sobre las cepas bacterianas *E. coli* y *S. aureus*, indicó que hubo una diferencia significativa de las fracciones frente al control positivo de crecimiento bacteriano (200 µL de bacteria). El valor para p se detalla en las Figuras correspondientes, donde:

* = $p < 0.05$;

** = $p < 0.01$;

*** = $p < 0.001$;

**** = $p < 0.0001$.

En base a los datos obtenidos y expuestos anteriormente, se confirma el potencial antimicrobiano que posee la secreción cutánea de los anfibios *A. spurrelli* y *P. tomopterna* sobre las cepas bacterianas ATCC® Gram + y Gram -.

El resumen, los resultados del ensayo con la muestra 1 de *A. spurrelli* se detallan en la Tabla 7, donde se indica el código LICBA de la muestra peptídica, el número de corrida, el número de fracción, la desviación estándar, el porcentaje de inhibición, el tipo de bioactividad (bactericida o bacteriostática) y la bacteria analizada (*S. aureus* o *E. coli*). Los resultados del ensayo con la muestra 2 de *A. spurrelli* se indican en la Tabla 8 y los resultados del ensayo con la muestra 3 de *P. tomopterna* se detallan en la Tabla 9.

Es importante considerar que la calidad de las secreciones cutáneas obtenidas puede ser afectada si es que los individuos permanecen en condiciones asépticas por tiempo prolongado (Llumiquinga, 2017), ya que según lo mencionado por Mangoni et al. (2001) para que se produzca la síntesis de ciertos compuestos como los AMPs es necesario que el individuo se encuentre en un ambiente que suscite el crecimiento de microorganismos para de esta forma estimular al sistema inmune y como consecuencia producir los AMPs. Esto es lo que normalmente sucede en la naturaleza, donde los anfibios están expuestos a gran cantidad de patógenos. Cuando se trabaja con individuos de laboratorio las condiciones cambian, no solamente en la dieta, sino evidentemente en el ambiente, porque son mantenidos en condiciones más estériles que en su ambiente natural. Con este antecedente se optó por realizar las extracciones cutáneas de los individuos de *A. spurrelli* inmediatamente que fueron colectados y ubicados en terrarios en Quito, respetando el lapso mínimo entre extracciones (3 semanas), para de esta forma minimizar la posibilidad de que los AMPs disminuyan.

En efecto, en el trabajo de Ramírez (2012) se menciona que solo dos fracciones de *A. spurrelli* (fracciones 56 y 69) exhiben amplio espectro de actividad al inhibir tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas; sin embargo, resulta interesante en el presente trabajo actual se detectaron 11 fracciones activas de amplio espectro, pues inhibieron tanto *Staphylococcus aureus* como *Escherichia coli*. Al analizar la muestra 1 (ver Tabla 7), el número de fracciones efectivas contra *E. coli* y *S. aureus* fue de 13 fracciones y con la muestra 2 (ver Tabla 8) se obtuvieron 11 fracciones activas contra *E. coli* y *S. aureus*.

El hecho de que el número de fracciones activas de amplio espectro obtenidas tanto de la muestra 1 como de la muestra 2, haya resultado ser mayor que el número de fracciones obtenidas en el estudio de Ramírez (2012), podría ser el resultado de haber realizado extracciones de las secreciones cutáneas a individuos que no han permanecido en cautiverio un tiempo prolongado, por lo que se sugiere realizar extracciones de las secreciones cutáneas de anfibios en el campo a fin de identificar mayor número de fracciones activas y a la vez optimizar recursos porque no habría la necesidad de movilización ni de mantenimiento de los especímenes.

Los individuos de *Phyllomedusa tomopterna* a los cuales se les realizaron extracciones no fueron individuos que llegaron recientemente del campo, pero de todas formas se obtuvo un número interesante de fracciones activas contra bacterias ATCC® Gram positivas y Gram negativas (13 fracciones), lo que permite especular que, si se hubiese trabajado con extracciones de individuos colectados recientemente del campo, este número de fracciones hubiese incrementado.

6.7 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA O BACTERIOSTÁTICA DE LAS FRACCIONES BIOACTIVAS

Debido a que se detectaron fracciones con efecto antibacteriano sobre *E. coli* y *S. aureus* fue necesario realizar ensayos adicionales donde se demuestre si este efecto es bactericida o bacteriostático. Dentro del contexto médico e investigativo, las fracciones con actividad bactericida serán de mayor interés porque son las que poseen la capacidad de destruir la bacteria de forma irreversible, a diferencia de las fracciones bacteriostáticas las cuales inhiben la multiplicación bacteriana, pero cuando el tratamiento se detiene, el crecimiento bacteriano se reanuda (Cordiés, Machado, y Hamilton, 2009).

Los resultados de la prueba de determinación de la actividad biológica de las fracciones peptídicas sobre cepas bacterianas ATCC® se detalla en las Tablas 7, 8 y 9, en las que se indica las fracciones que resultaron ser bacteriostáticas o bactericidas. Al analizar los resultados de la Tabla 7 se observó un total de 18 fracciones activas de *A. spurrelli* contra *E. coli*: 3 fracciones bacteriostáticas y 15 bactericidas.

En esta misma Tabla, también se observaron las fracciones de *A. spurrelli* contra *S. aureus*: 16 fracciones activas en total, de estas, 6 fracciones bacteriostáticas y 10 bactericidas. De las fracciones mencionadas, 13 resultaron activas tanto para *E. coli* como para *S. aureus* que son las fracciones 35, 36, 37, 38 39, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48 y 49. Al inhibir el crecimiento tanto de una bacteria representante Gram negativa como de una Gram positiva, se les podría calificar a estas fracciones, como de amplio espectro.

En la Figura 19 se observa un ejemplo de cómo se evaluó la actividad bactericida o bacteriostática de cada fracción, en este caso sobre *E. coli* y en la Figura 20, sobre *S. aureus*. La caja Petri contiene medio enriquecido y cada punto contiene a la bacteria con la respectiva fracción. Donde se pudo detectar colonias bacterianas se pone en evidencia que éstas son fracciones bacteriostáticas. En los puntos restantes, en los que no se observa crecimiento bacteriano, las fracciones corresponden a las que presentan efecto bactericida.

El hecho de detectar que de las fracciones que exhibieron bioactividad, unas presenten propiedades bactericidas y otras bacteriostáticas, sugiere que el mecanismo de acción de los péptidos contenidos en ellas es diferente. De hecho, el posible mecanismo de acción de las fracciones bactericidas se debe a la estructura catiónica y anfipática de los péptidos antimicrobianos. Éstos, al estar cargados positivamente, establecen una interacción electrostática con la carga negativa que presenta la membrana de las bacterias, lo que provoca su lisis. Por lo tanto, los péptidos bacteriostáticos producirían la muerte celular por necrosis, ya que ésta incluye una serie de eventos que conducen a la ruptura de la membrana citoplasmática que provoca la expulsión del contenido celular (Agudelo y López, 2010).

Por otro lado, el mecanismo de acción de los compuestos bacteriostáticos se produce por la inhibición de la síntesis de las proteínas, con excepción de los aminoglucósidos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). Por lo tanto, probablemente el péptido presente en la fracción bacteriostática no lise la membrana, sino que logre penetrarla y de esta forma actuar sobre la maquinaria metabólica, inhibiendo la síntesis de las proteínas. Es por ello que la bacteria tiene la probabilidad de reactivarse cuando ya no está bajo el efecto del antimicrobiano bacteriostático.

6.8 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LA SECRECIÓN CUTÁNEA DE *Agalychnis spurrelli* Y *Phyllomedusa tomopterna* SOBRE LA LÍNEA CELULAR A549

El cáncer es una de las enfermedades catalogadas como crónicas no transmisibles que afecta a un número alarmante de personas a nivel mundial, por lo que es de vital importancia, tanto social como científica, detectar compuestos que sirvan para un eficiente tratamiento de esta enfermedad.

Estudios previos han revelado que las secreciones cutáneas totales de las dos especies analizadas en este trabajo, *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna*, son efectivas en el control de células cancerígenas leucémicas (Chuang, 2012; Vallejo, 2016). Por esto, se hace necesario detectar una posible actividad citotóxica contra otros tipos de cáncer, en este caso, sobre la línea cancerígena de pulmón A549; además se debe detectar la o las moléculas específicas responsables de esta importante actividad con el fin de hallar, a futuro, terapias alternativas que ocasionen el menor número de efectos secundarios en los pacientes que padecen esta enfermedad.

En esta investigación se analizó la capacidad anticancerígena de la secreción cutánea total de *A. spurrelli* y *P. tomopterna* y de las fracciones peptídicas de ésta última, sobre la línea celular de cáncer de pulmón ATCC® A549. Esta línea celular comercial, fue obtenida por la remoción y posterior cultivo del tejido canceroso del tumor de un hombre de 58 años. Se decidió trabajar con ella en base a los alarmantes datos de prevalencia e incidencia de este tipo de cáncer, el mismo que constituye una de las enfermedades con mayor número de víctimas mortales, no solo en Ecuador, sino alrededor del mundo. Específicamente en nuestro país, la incidencia de cáncer de pulmón alcanza el 9.3% (Wong et al., 2017), ocupando el tercer lugar de defunciones por afecciones carcinogénicas.

Para analizar el efecto de las secreciones cutáneas de los anfibios mencionados se aplicaron técnicas de cultivo celular que permiten el crecimiento de las células en condiciones controladas. Si bien es cierto que se puede trabajar a partir de aislados clínicos de pacientes, es recomendable trabajar con líneas celulares, pues éstas incluyen células de un tipo único que se han adaptado para crecer continuamente en condiciones controladas de laboratorio.

Para obtener resultados confiables, es indispensable contar con células libres de cualquier tipo de contaminación microbiana que podrían afectarlas directamente, proyectando lecturas de absorbancia erróneas en los ensayos de citotoxicidad. Por eso, como medida necesaria para el manejo de líneas celulares, se realizó el cultivo de las células de forma aséptica y extremadamente rigurosa. El manejo incluyó desde la preparación de medio hasta la congelación de las células, aplicando protocolos pre establecidos y reportados en los libros de cultivo celular (Miltenyi Biotec et al., 2010; Giard, et al., 1973).

6.8.1 DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Las células cancerígenas, sean de cualquier tipo, deben ser criopreservadas con el fin de contar con un stock viable cuando sea necesario realizar ensayos con éstas. Por lo tanto, es fundamental que la descongelación de éstas se realice cuidadosamente para no afectar la viabilidad celular.

Si bien la descongelación celular es un procedimiento relativamente sencillo, debe realizarse sólo con un criotubo a la vez, ya que se corre el riesgo de que éste se descongele rápidamente y las células entren en contacto directo con el DMSO, el cual es altamente tóxico para éstas. De todas formas, si es necesario trabajar con más de un criotubo simultáneamente, los criotubos a descongelar, deben ser almacenados a -80 °C durante máximo una hora.

Además, la descongelación de cada criotubo debe ser máximo de un 50% para que las células no estén en contacto con el DMSO a temperatura ambiente. El DMSO es una sustancia idónea para la congelación de células pero a temperatura ambiente produce lisis celular, de hecho, se ha investigado la acción anticancerígena derivada del DMSO (Wang, Lin, Lai, Liu, Hsu, Chen, 2012) y en esta investigación se empleó este reactivo como control positivo de citotoxicidad. Solo se pudo evaluar el éxito de la descongelación celular dentro de las 48 a 72 horas siguientes al determinar la confluencia celular.

6.8.2 CAMBIO DE MEDIO

El éxito de los cultivos celulares depende en gran medida de la calidad del medio de cultivo por lo que se hace necesario realizar cambios periódicos de éste. El cambio de medio es importante porque éste proveerá los nutrientes necesarios para que haya un crecimiento celular exitoso (Miltenyi Biotec et al., 2010) y debe realizarse en condiciones de total asepsia puesto que, al ser altamente nutritivo, es fuente fácil de contaminación fúngica y bacteriana.

El cambio de medio fue necesario después de varios eventos como por ejemplo después de disgregar las células porque en este procedimiento enzimático, al emplear la tripsina, puede afectarlas. Además, es necesario realizar cambio de medio, cuando se observen células muertas o pequeñas partículas inmóviles que son los desechos de su metabolismo.

El cambio en el color en el medio de un rosa claro a fucsia es indicativo de que hubo variación en el pH del medio y cuando éste cambia a una tonalidad naranja oscuro es indicativo de contaminación. En el primer caso bastó con suplementar con 1% de HEPES, mientras que en el segundo caso se procedió a desechar la alícuota del medio contaminado (Ferguson et al., 1980; Miltenyi Biotec et al., 2010).

6.8.3 PASE DE CÉLULAS

Es conocido que la velocidad de división de células malignas es increíblemente rápida, por lo cual, al cabo de 48 horas, ya es posible observar confluencia celular en un flask de 25 mL, condición fundamental para realizar pasaje celular (Figura 3).

La confluencia celular es una medida de estimación de la densidad de las células adherentes la cual se usa como medida de la proliferación. Las células varían su crecimiento en función de la densidad que presenten; es decir, el cultivo que presente células de baja densidad (10-20%) es más susceptible a un lento crecimiento en comparación con aquel que se encuentre a un 50% de confluencia (Miltenyi Biotec et al., 2010).

Para realizar el pasaje celular se emplearon reactivos como la enzima tripsina EDTA la cual rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis, liberando de esta forma las células de la superficie de crecimiento con el fin de tenerlas en suspensión (Figura 4). Al estar las células en contacto prolongado con esta enzima se produce daño de éstas, por lo que se debe inhibir su función mediante el empleo de suero fetal bovino desactivado (FBS).

La tripsina EDTA fue precalentada dos minutos previos a su uso ya que al ser una enzima y estar expuesta al calor prolongadamente puede desnaturalizarse y como consecuencia interferir en el proceso de disgregación de las células. Además, la tripsina EDTA digiere las moléculas que producen adherencia de las células sobre una determinada superficie y actúa como quelante de Ca^{2+} y Mg^{2+} para separar las células rápidamente de la superficie donde se han adherido (Lehninger, 2009).

En el caso puntual de las células A549 es necesario el uso de la tripsina EDTA, seguido de incubación a 37 °C y CO_2 al 5% durante dos minutos ya que estas células se adhieren al flask formando una monocapa. Transcurridos los minutos de incubación se debe comprobar mediante el microscopio invertido que todas las células, o al menos la mayoría de ellas, se hayan disgregado (Figura 4) y en caso de requerir más tiempo de exposición a la tripsina se puede adicionar un minuto. Como se mencionó anteriormente, luego de la exposición de las células a la tripsina EDTA, es imprescindible añadir 1 mL de suero fetal bovino, el cual tiene función inhibitoria sobre la tripsina, lo cual evita daños en las células, al neutralizar la actividad de las proteasas, y de esta forma proteger a las proteínas celulares de la digestión enzimática (Sigma, 2008).

Una vez que se empleó la tripsina y las células colectadas se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL para centrifugar a 1000 r.p.m. durante 7 minutos, se pudo observar un pellet de color blanquecino que es donde se depositan las células. Luego de homogenizar el pellet en 1 mL de medio, se realizó el conteo celular y si este número obtenido fue de al menos 4×10^6 de células en los flask de 25 mL o de 8×10^6 de células en los flask de 75 mL, se procedió a realizar pasaje celular; de lo contrario, si el número es menor, las células podrían sufrir estrés, además de presentar un crecimiento celular lento ya que, como se mencionó anteriormente, las células varían su crecimiento en función de la densidad que presenten (Sigma, 2008).

6.8.4 CONGELACIÓN CELULAR

La congelación celular permite almacenar alícuotas celulares por tiempo prolongado sin la necesidad de mantenerlas en cultivo indefinidamente. Esto se realiza mediante un procedimiento escalonado de congelación empleando un medio idóneo que contiene sustancias como el Dimetil Sulfóxido (DMSO) y Suero Fetal Bovino (FBS), las cuales protegen las células una vez que están en etapa de criopreservación (Cheng, Wang, Spitz, y Wei, 2001).

Si bien el DMSO es tóxico para las células a temperatura ambiente, cumple un papel importante en su criopreservación porque restringe la permeabilidad de la membrana de las células al agua, por lo cual se evita que se formen cristales de agua en el interior de éstas, evitando que las células se lisen. Por otra parte, el SBF es importante porque actúa como fuente de nutrientes cuando se descongelan las células, además sirve como amortiguamiento para éstas, durante la descongelación (Miltenyi Biotec et al., 2010; Thermo Fisher Scientific, 2016).

El medio de congelación que se empleó para las células A549 contuvo: 800 µL de SBF + 100 µL de DMSO + 100 µL de células. Considerando que el DMSO es tóxico para las células, es indispensable mezclar los criotubos por inversión constantemente hasta congelarlos. El proceso de congelación se realizó en gradiente, inicialmente a -20°C durante 4 horas y luego a -150°C o a un tanque de nitrógeno según la disponibilidad; si no se realiza el proceso de forma escalonada, se corre el riesgo de afectar la viabilidad de las células.

6.8.5 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD ENZIMÁTICA

Con el fin de evaluar el efecto de las secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* sobre la línea celular A549 de cáncer de pulmón, se realizó la prueba de citotoxicidad MTT. Esta prueba colorimétrica se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, formando cristales de formazán de color azul cuando el MMT está en contacto con células vivas que exhiben funcionalidad

mitochondrial (American Type Culture Collection, 2011). La cantidad de cristales de formazán producida se detecta por la intensidad del color azul, que es proporcional a la cantidad de células vivas.

Al analizar los resultados de los dos primeros ensayos sobre células A549 ATCC® de cáncer de pulmón, se determinó que la especie *A. spurrelli* no presenta diferencias significativas con ninguna de las concentraciones analizadas (Figuras 21 y 22), es decir, no es una secreción efectiva en el tratamiento contra las células de cáncer de pulmón a las concentraciones 50 µg/mL, 25 µg/mL y 12.5 µg/mL. Este dato resulta interesante, ya que la secreción de *A. spurrelli* si resultó eficiente en el tratamiento contra leucemias agudas pero no contra leucemias crónicas.

Probablemente la secreción cutánea total no sea eficiente en el tratamiento contra leucemias crónicas porque en este caso las células están formadas por membranas celulares muy compactas, aumentando de ésta forma la cantidad de colesterol y de lípidos, lo que a su vez permite resistir al ataque de los péptidos de los anfibios (Sok, Šentjunc, y Schara, 1999). Por lo tanto, es probable que esté sucediendo una interacción similar entre los péptidos y la composición de la membrana de estas células tumorales de pulmón.

Por otro lado, la secreción cutánea total de *P. tomopterna* si presentó actividad anticancerígena a la concentración 25 µg/mL, únicamente, con una diferencia significativa de $p > 0.05$, por lo que podemos concluir que a esta concentración la secreción cutánea total de esta especie de anfibio es efectiva.

En el tercer ensayo de citotoxicidad se observó que la secreción de *A. spurrelli*, si presenta citotoxicidad a la concentración de 3.125 mg/mL con una supervivencia celular del 23%. *P. tomopterna*, presenta citotoxicidad a los 6.25 mg/mL con una supervivencia de células del 30%. Se observa que las concentraciones más bajas de secreción presentan mayor citotoxicidad, tanto de *A. spurrelli* como de *P. tomopterna* (Figura 23).

El hecho de que a concentraciones muy altas los péptidos no lleguen a lisis las células cancerígenas puede deberse a que, al tener poco contenido de agua, es menos probable que la región hidrofílica de péptidos anfipáticos interactúe con la región hidrofílica de la membrana plasmática de las células tumorales; es decir, la muerte celular

aumenta al disminuir la concentración de péptido. Los resultados se grafican en la Figura 23 y la respectiva curva de citotoxicidad en la Figura 24.

En el cuarto ensayo de citotoxicidad con la secreción total de las especies, se determinó la menor concentración con efecto citotóxico. En la Figura 25 se observa que la especie *A. spurrelli* presenta citotoxicidad desde los 3.125 µg/mL hasta los 195.31 µg/mL, pero desde la concentración 97.66 µg/mL hasta la concentración 1.35 µg/mL la absorbancia es igual que el control negativo (pocillos con células sin tratamiento), es decir, no se evidenció citotoxicidad. Al analizar los resultados con la prueba de ANOVA de una sola vía con un post test de Dunnet al 95% de confianza, se determinó que entre el control positivo de citotoxicidad (pocillos con ácido acético al 1%) y las concentraciones desde los 3125 µg/mL hasta los 195.31 µg/mL, existe significancia estadística con $p < 0.0001$. La supervivencia celular a la concentración de 3125 µg/mL es del 27% mientras que en la concentración de 195.31 µg/mL la supervivencia es apenas del 4%. Igualmente, estos valores son estadísticamente significativos al ser analizados con prueba ANOVA de una sola vía y un post test de Dunnet en un intervalo de confianza del 95%, con un valor de $p < 0.0001$.

Al analizar la acción de la secreción de *P. tomopterna* en la Figura 26, se observa que hay citotoxicidad desde la concentración 6250 µg/mL hasta los 195.31 µg/mL, ya que, a concentraciones más bajas que éstas, ya no se observa un efecto citotóxico y se produce proliferación de las células. Se realizó un análisis de varianza de una vía con un post test de Dunnet a un intervalo de confianza del 95% donde se determinó que tanto el control positivo de citotoxicidad (ácido acético 1%) y las concentraciones desde 6250 µg/mL hasta 390.625 µg/mL mostraron valores significativos frente al control negativo de citotoxicidad (células); es decir, esas concentraciones presentan actividad citotóxica frente a las células A549. Además, se determinó que la supervivencia celular a la concentración 6250 µg/mL fue del 62%, mientras que la concentración más baja (390.625 µg/mL) existe apenas el 4% de células vivas. El análisis de Dunnet con un intervalo de confianza del 95% determinó significancia estadística de $p < 0.0001$ y de $p < 0.01$, según la concentración.

En resumen, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la menor concentración de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* que mantiene el efecto citotóxico es de 195.31 µg/mL, pues presenta una supervivencia de las células

cancerígenas, solo del 4%. En *P. tomopterna* la supervivencia celular del 4% se produjo a una concentración de 390.625 µg/mL (Figura 27).

Las placas resultantes del ensayo después de la lectura de citotoxicidad con células A549 mediante el empleo de MTT, se observan en la Figura 28, donde se puede observar el cambio de coloración de un violeta intenso, en los pocillos con célula vivas, a un amarillo pálido en aquellos en los que la fracción tuvo efecto citotóxico.

Las células control A549 ATCC® se observa en la Figura 29, el efecto del solvente empleado para la dilución de las fracciones peptídicas (BSA 0.2% + ácido acético 0.01%) se observa en la Figura 30. En la Figura 31 se observa el efecto del control positivo de citotoxicidad (ácido acético al 10%) sobre las células A549 ATCC®.

Desde la Figura 32 hasta la Figura 42 se observa el efecto de la secreción cutánea total de *A. spurrelli* sobre las células A549 ATCC®, partiendo de la concentración 3125 µg/mL, en diluciones seriadas, hasta la concentración 1.53 µg/mL. Desde la Figura 43 hasta la Figura 55 se observa el efecto de la secreción cutánea total de *P. tomopterna* sobre las células A549 ATCC®, partiendo de la concentración 6250 µg/mL, en diluciones seriadas, hasta la concentración 1.53 µg/mL.

Una vez comprobada la citotoxicidad de la secreción cutánea total se procedió a realizar una Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para recuperar las fracciones derivadas de la secreción cutánea total y determinar cuál de ellas es la responsable de la actividad anticancerígena, iniciando con este paso, la prepurificación de los péptidos presentes.

Las placas resultantes del ensayo de citotoxicidad con células A549 ATCC®, mediante el empleo de la técnica colorimétrica MTT, se observan en la Figura 56. Se observan pocillos color violeta intenso en aquellos que contienen células vivas, es decir, no se evidenció efecto citotóxico de las fracciones; por otro lado se observan pocillos de color amarillo pálido en aquellos que no contienen células vivas, es decir, donde las fracciones si presentaron efecto citotóxico. También se pueden observar pocillos de color violeta tenue; esta tonalidad se produjo porque, a pesar de que hubo acción citotóxica, no murió la totalidad de las células presentes en el pocillo; resultando en una coloración violeta tenue.

La coloración violeta fue causada por las células vivas que son capaces de reducir metabólicamente al bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, enzima que es funcional únicamente en las células vivas. Como resultado de la interacción entre el MTT y la enzima succinato-deshidrogenasa se formaron cristales de formazán. Estos cristales al estar en contacto con el DMSO, liberan un colorante violeta. Posteriormente, la absorbancia resultante se leyó y este valor fue un indicador de la acción citotóxica del tratamiento experimental, en este caso, de la secreción cutánea total y sus respectivas fracciones.

Como se mencionó previamente, se analizó únicamente el efecto de las fracciones de la especie *P. tomopterna*. De estas fracciones, las que mostraron actividad citotóxica sobre la línea de cáncer de pulmón fueron 26 (33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60). Todas éstas mostraron una significancia estadística de $p < 0.0001$ al comparar con las células sin tratamiento (Figuras 56, 57, 58 y 59). De las 26 fracciones citotóxicas mencionadas anteriormente, las fracciones 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 46, 47, 48 y 49, fueron altamente citotóxicas puesto la tonalidad del pocillo fue de un amarillo pálido. Las fracciones 39, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y 60 presentaron una citotoxicidad media porque la tonalidad de los pocillos fue de un violeta tenue.

Con estos datos se elaboró una curva de citotoxicidad (Figura 59) donde se confirmó que las fracciones altamente citotóxicas son las idóneas para que sigan siendo analizadas y purificadas con el fin de obtener la secuencia de aminoácidos que están formando parte de los posibles péptidos presentes en éstas y así elaborar medicamentos alternativos al tratamiento empleando la quimioterapia.

Cabe recalcar que las fracciones de *P. tomopterna* más relevantes fueron: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 46, 47, 48 y 49, ya que presentaron actividad tanto anticancerígena sobre la línea celular A549 ATCC®, como antimicrobiana sobre bacterias Gram + (*S. aureus*) y Gram – (*E. coli*). Esto permite ratificar que el mecanismo de acción de estas fracciones, probablemente sea el resultado de las interacciones electroestáticas propias de los péptidos presentes en las fracciones derivadas de la secreción cutánea de

este anfibio, lo que produjo lisis celular y que permitió destruir tanto a las células cancerígenas A549 ATCC® como a las bacterias *E. coli* y *S. aureus*.

Podemos pensar que éste es el mecanismo de acción ya que en la bibliografía se menciona que normalmente una célula sana presenta una pared celular con carga positiva, pero el momento que se convierte en célula maligna, las cargas de la pared celular cambian a negativas. Este cambio en las cargas permite la interacción electrostática entre la membrana cargada negativamente con el péptido con cargas positivas, lo que produce la muerte celular por necrosis debido a la lisis de la membrana.

6.9 PRUEBAS HEMOLÍTICAS

Considerando que el presente trabajo tiene como objetivo encontrar moléculas que sean una alternativa en el tratamiento convencional de enfermedades neoplásicas malignas e infecciones bacterianas, es necesario realizar ensayos que determinen los posibles efectos adversos de estas moléculas en la salud de los pacientes (Kirschbaumweg, 2002). En este caso se analizó el porcentaje de destrucción de hematíes, por lo tanto de liberación de hemoglobina, en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*, causada por la administración de los compuestos presentes en las fracciones recuperadas de la secreción cutánea total de las dos especies de hílidos testeadas en este estudio.

Las pruebas hemolíticas son ensayos de evaluación de hemocompatibilidad de una determinada sustancia (Kirschbaumweg, 2002). En este trabajo se evaluó el grado de hemólisis de las fracciones obtenidas a partir de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*.

En la Figura 60 se observa el grado de hemólisis de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* que mostraron ser activas contra las bacterias *E. coli* ATCC® y/o *S. aureus* ATCC® y contra la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. En la Figura 60 se evidencia que las fracciones son estadísticamente significativas en comparación con el control negativo de hemólisis, lo cual indica que

ninguna de las fracciones testeadas provoca lisis en más del 50% de los eritrocitos (DL<50).

Es necesario puntualizar que se analizó la actividad antibacterial de las fracciones recuperadas de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli*, mas no la actividad anticancerígena, ya que hubo inconvenientes con el equipo que concentra y retira las fases móviles empleadas en la separación cromatográfica (ácido trifluoroacético y acetonitrilo) mismas que podrían presentar un efecto tóxico con las células evaluadas.

La prueba hemolítica de las fracciones recuperadas a partir de la secreción cutánea total de *A. spurrelli* se observa en la Figura 61, dónde se evidencia que todas las fracciones mostraron una diferencia estadística significativa con respecto al control positivo. El porcentaje de hemólisis se observa en la Figura 62 y Tabla 10, donde se evidencia que las fracciones altamente citotóxicas no son presentan efectos hemolíticos significativos. Incluso, las fracciones con mayor hemólisis presentan una dosis letal menor a 50 (DL<50). Estas fracciones son la 37 (17.42%), 39 (17.92) y 40 (16.92). Esto sustenta el hecho de que las secreciones de la piel de *Agalychnis spurrelli* son altamente prometedoras como alternativa terapéutica para tratar afecciones tanto bacterianas como neoplásicas malignas pulmonares.

Por otro lado, los resultados hemolíticos provenientes de las fracciones obtenidas a partir de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* que resultaron activas para las bacterias *E. coli* ATCC® y/o *S. aureus* ATCC® y para la línea celular de cáncer de pulmón A549 se evidencia en la Figura 63. En esta Figura se constata que todas las fracciones con efecto citotóxico provocan hemólisis menor a 50% (DL<50) y son estadísticamente significativas al comparar con el control negativo de hemólisis.

La prueba de hemólisis se observa en las Figuras 64 y el porcentaje de hemólisis se observa en las Figuras 65 y Tabla 11, donde se evidencia que solamente las fracciones 40 y 41 presentan un porcentaje de hemólisis alto y no mayor al 50% de estos. Los porcentajes de hemólisis de las fracciones fueron de 45.022 % y 21.45 %, respectivamente.

Constatar que, a partir de la secreción cutánea de las especies analizadas, se pudieron recuperar varias fracciones no hemolíticas con actividad antimicrobiana y/o

anticancerígena, ratifica que los anfibios no solamente son la piedra angular de diversas cadenas tróficas, sino que, además, producen y/o bioacumulan un incalculable número de moléculas con potenciales aplicaciones biomédicas.

7. CONCLUSIONES

1. *Agalychnis spurrelli* presentó 24 fracciones peptídicas con importante actividad antibacteriana, de las cuales las fracciones 31-49, 50-52, 54, 63 tuvieron actividad contra *Escherichia coli* y las fracciones 35-52 contra *Staphylococcus aureus*.
2. De las 24 fracciones peptídicas de *Agalychnis spurrelli* con actividad antimicrobiana, 15 pueden ser catalogadas como fracciones peptídicas de amplio espectro (fracciones 35-49), pues inhibieron el crecimiento tanto *E. coli* (bacteria Gram -) como de *S. Aureus* (bacteria Gram +).
3. En *A. spurrelli* el 67 % de las fracciones peptídicas de amplio espectro, tiene acción bactericida sin presentar actividad hemolítica., por lo que éstas (35-43, 46-49), se convierten en candidatas idóneas para el desarrollo de antibacterianos alternativos. Las otras fracciones, pese a no ser hemolíticas, solo son bacteriostáticas.
4. La secreción total de *A. spurrelli* tiene efecto citotóxico contra la línea celular de cáncer de pulmón A549 a concentraciones entre 3125 µg/mL y 195,31 µg/mL.
5. *Phyllomedusa tomopterna* tiene 19 fracciones peptídicas con importante actividad antibacteriana, de las cuales, las fracciones 3, 20, 31-43, 46-49 tuvieron actividad contra *Escherichia coli* y las fracciones 35-43 y 46-49 contra *Staphylococcus aureus*.
6. De las 19 fracciones peptídicas de *P. tomopterna* con actividad antimicrobiana, 14 son fracciones peptídicas son de amplio espectro (fracciones 35-43, 46-49), pues inhibieron el crecimiento tanto *E. coli* como de *S. aureus*.
7. En *P. tomopterna*, las fracciones que son candidatas idóneas para el desarrollo de antibacterianos alternativos son: 35-39, 47 y 48, pues éstas son de amplio espectro con acción bactericida. Las fracciones 42, 43 y 49, únicamente son bacteriostáticas.

8. La secreción total de *Phyllomedusa tomopterna* tiene efecto citotóxico contra la línea celular de cáncer de pulmón A549, a concentraciones entre 6250 µg/mL y 195,31 µg/mL.
9. *Phyllomedusa tomopterna* tiene 14 fracciones peptídicas con importante actividad citotóxica contra la línea de cáncer de pulmón A549, sin presentar actividad hemolítica.
10. Las fracciones 35-39, 47 y 48 de *P. tomopterna* presentan actividad citotóxica contra *E. coli*, *S. aureus* y sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549.
11. En definitiva, los resultados obtenidos en esta investigación ratifican el hecho de que los péptidos antimicrobianos y anticancerígenos provenientes de la secreción de la piel de anfibios, en este caso, *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna*, son moléculas sumamente prometedoras que podrían contribuir a dar solución a graves problemas de salud pública, como son la resistencia bacteriana y el cáncer, enfermedades se han incrementado a nivel mundial.

8. RECOMENDACIONES

Las recomendaciones presentes en esta sección son en base a las experiencias personales durante el proceso de elaboración de este proyecto. Es importante considerar que las condiciones pueden variar debido a diversos factores, como los ambientales, por lo que es importante que cada investigador sea responsable de adaptar los procedimientos a las necesidades particulares y familiarizarse con los riesgos que puede significar realizar un ensayo determinado.

1. Si se va a realizar la separación de compuestos de una muestra mediante la técnica HPLC, se recomienda trabajar con reactivos de grado HPLC para evitar daños en la columna y prolongar la vida del equipo.
2. En cultivo celular es indispensable la asepsia tanto del área de trabajo como de los reactivos empleados y del técnico responsable, para de esta forma mantener a las células libres de contaminación microbiana, fúngica o de cualquier otro tipo.
3. Se recomienda que los ensayos de citotoxicidad se los realicen a través del tiempo; es decir, no solamente a las 24 horas, sino a las 48, 72, 96 horas, etc., con el fin de evaluar el tiempo que las respectivas fracciones mantienen la acción citotóxica.
4. El hecho de que la secreción cutánea total resulte ser hemolítica, no debe ser un limitante para que, a partir de ella, se busquen nuevas moléculas bioactivas. Hay que tomar en cuenta que en la secreción total existe un sin número de moléculas y aquellas que presenten una bioactividad benéfica, no necesariamente son las responsables de la hemólisis. Por ejemplo, en el estudio de Vallejo, 2016 se determinó que la secreción total de *Phyllomedusa tomopterna* es sumamente hemolítica, sin embargo, al analizar las diferentes fracciones individualmente, ninguna de las que tuvieron actividad antimicrobiana o anticancerígena, lisó a los eritrocitos.

5. Probar las fracciones de la secreción de *Agalychnis spurrelli* sobre líneas celulares cancerígenas. El hecho de que la secreción total de *Agalychnis spurrelli* sea capaz de matar células cancerígenas de leucemia y de cáncer de pulmón, vuelve imperativa la necesidad de realizar un estudio minucioso para determinar, cuál o cuáles de las fracciones presentes en ella, son las responsables de la actividad anticancerígena.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A549 Cell Line Transfection Protocol Reagent Method. (2018). Recuperado el 14 de marzo de 2018 de: <http://www.a549.com/>.
- Agudelo, María Elena Ramírez, y López, Mauricio Rojas. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 166-177.
- American Cancer Society. (2018). ¿Qué es el cáncer? Recuperado el 9 de marzo de 2018 de: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
- American Type Culture Collection. (2011). MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide. *Components*, 6597, 1-6. doi:ATCC 30-1010K
- ATCC. (2014). Animal Cell Culture Guide. *ATCC.ORG*. doi:10.1093/chemse/bjt099
- Baron, Samuel. (1996). *Medical microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Bevins, C. L., y Zasloff, M. (1990). Peptides from frog skin. *Annual review of biochemistry*, 59(1), 395-414. doi:10.1146/annurev.biochem.59.1.395
- Bridges, Victoria, Koprak, Chris, y Johnson, Reginal. (2001). The Reptile and Amphibian Communities in the United States. *Centers for Epidemiology and Animal Health*, 970(January), 490-8000.
- Caicedo, Andrés. (2007). *Análisis de las secreciones peptídicas de anfibios ecuatorianos con pruebas de susceptibilidad en bacterias patógenas*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Calvo, Jorge, y Martínez-Martínez, Luis. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Carrillo, Luis, y Pavajeau, Lissette. (2008). Arca de los anfibios, 64. Recuperado de: [http://www.amphibianark.org/pdf/YOTF/WAZA Global InfoPack Spanish.pdf](http://www.amphibianark.org/pdf/YOTF/WAZA%20Global%20InfoPack%20Spanish.pdf)
- Chakraborty, Sajib, y Rahman, Taibur. (2012). The difficulties in cancer treatment. *Ecancermedicalscience*, 6, 5. doi:10.3332/ecancer.2012.ed16
- Cheng, L., Wang, L. E., Spitz, M. R., y Wei, Q. (2001). Cryopreserving whole blood for functional assays using viable lymphocytes in molecular epidemiology studies. *Cancer Letters*, 166(2), 155-163. doi:10.1016/S0304-3835(01)00400-1
- Chuang, Po Hao. (2012). *Evaluación de la actividad anticancerígena del extracto peptídico crudo de Agalychnis spurrelli*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

- Dillón, Ximena. (2012). *Identificación de fracciones con actividad antimicrobiana obtenidas del exudado de la piel de Agalychnis spurrelli (Anura:Hylidae)*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Clark, Valerie. (2009). Collecting arthropod and amphibian secretions. *Behavioral and Chemical Ecology*, 1-46.
- Clarke, B. T. (1997). The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72(3), 365-79. doi:10.1111/j.1469-185X.1997.tb00018.x
- Conlon, Michael, Mechkarska, Milena, Lukic, Miodrag, y Flatt, Peter. (2014). Potential therapeutic applications of multifunctional host-defense peptides from frog skin as anti-cancer, anti-viral, immunomodulatory, and anti-diabetic agents. *Peptides*, 57, 67-77. doi:10.1016/j.peptides.2014.04.019.
- Cordiés, Lilliam, Machado, Looney, y Hamilton, María. (2009). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*, 8(1), 13-27.
- Daly, John, Garraffo, Martin, Spande, Thomas, Giddings, Lesley, Saporito, Ralph, Vieites, David, y Vences, Miguel. (2008). Individual and Geographic Variation of Skin Alkaloids in Three Swamp-Forest Species of Madagascan Poison Frogs (Mantella). *Journal of Chemical Ecology*, 41(9), 837-847. doi:10.1007/s10886-015-0616-4
- Díes López-Ayllón, Blanca. (2013). Estudio de la resistencia a quimioterapia en células con características de cancer stem cells (CSC) derivadas de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP). Recuperado de: <http://www.tdx.cat/handle/10803/282119>
- Duellman, William, y Trueb, Linda. (1994). *Biology of Amphibians*. JHU press.
- Erspamer, V., Erspamer, G. Falconieri, y Cei, J. M. (1986). Active peptides in the skins of two hundred and thirty American amphibian species. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 85(1), 125-137. doi:10.1016/0742-8413(86)90063-0
- Ferguson, Wilfred J., Braunschweiger, K. I., Braunschweiger, W. R., Smith, James R., McCormick, J. Justin, Wasmann, Cathy C., ... Good, Norman E. (1980). Hydrogen ion buffers for biological research. *Analytical Biochemistry*, 104(2), 300-310. doi:10.1016/0003-2697(80)90079-2
- Gomes, Antony, Giri, Biplab, Saha, Archita, Mishra, R., Dasgupta, Subir C., Debnath, A., y Gomes, Aparna. (2007). Bioactive molecules from amphibian skin: Their biological activities with reference to therapeutic potentials for possible drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(7), 579-593.
- Grant, Jacqueline, y Land, Bruce. (2002). Transcutaneous Amphibian Stimulator (TAS): A device for the collection of amphibian skin secretions. *Herpetological Review*, 33(1), 38-41.
- Guidolquim. (2014). El proceso de la liofilización. Recuperado el 24 de agosto de 2018 de:

<http://www.ub.edu/talq/es/node/261>.

- Harris, Reid N., Brucker, Robert M., Walke, Jenifer B., Becker, Matthew H., Schwantes, Christian R., Flaherty, Devon C., ... Minbiole, Kevin P. C. (2009). Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *The ISME Journal*, 3(7), 818-24. doi:10.1038/ismej.2009.27.
- He, Jian, Eckert, Randal, Pharm, Thanh, Simanian, Maurice D., Hu, Chuhong, Yarbrough, Daniel K., ... Shi, Wenyuan. (2007). Novel synthetic antimicrobial peptides against *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1351-1358. doi:10.1128/AAC.01270-06.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2017). Tipos de tratamiento para Cáncer. *Instituto Nacional de Cáncer*. Recuperado el 10 de mayo de 2018 de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>.
- Jemal, Ahmedin, Siegel, Rebecca, Ward, Elizabeth, Hao, Yongping, Xu, Jiaquan, y Thun, Michael J. (2009). Cancer Statistics. *CA: a cancer journal for Clinicians*, 59(4), 225-249. doi:10.3322/caac.20006.
- Kim, Hyung Soo, Chung, Wookyoung, y Kim, Sejoong. (2011). Vitamin d, and kidney disease. *Electrolyte & blood pressure: E & BP*, 9(1), 1-6. doi:10.5049/EBP.2011.9.1.1.
- Kirschbaumweg, Thomas. (2002). Haemolysis as influence and interference factor. *The Journal Of The International Federation Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine*, 13(4), 1-4.
- Laird, Eamon, Ward, Mary, McSorley, Emeir, Strain, J. J., y Wallace, Julie. (2010). Vitamin D and bone health; Potential mechanisms. *Nutrients*, 2(7), 693-724. doi:10.3390/nu2070693.
- Lehninger, Nelson. (2009). *Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega.
- Llumiquinga, Miguel. (2017). *Potencial antimicrobiano de la secreción cutánea total de anuros ecuatorianos sobre cepas bacterianas tipo y aislados clínicos multirresistentes*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Lomonte, Bruno. (2015). *Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica*. Universidad de Costa Rica, 0-54.
- Marenah, L., Shaw, C., Orr, D., McClean, S., Flatt, P., y Abdel-Wahab, Y. (2004). *Isolation and characterisation of an unexpected class of insulinotropic peptides in the skin of the frog Agalychnis litodryas*. *Regulatory Peptides*, 120(1-3), 33-38. doi:10.1016/j.regpep.2004.02.007.
- Masschelein-Kleiner, Liliane. (2004). *Los solventes*. Centro Nacional de Conservación y Restauración (Vol. 1). Recuperado de: [https://8498725384723578416-a-1802744773732722657-s-sites.googlegroups.com/site/evachicorestauracion/Los disolventes.pdf](https://8498725384723578416-a-1802744773732722657-s-sites.googlegroups.com/site/evachicorestauracion/Los%20disolventes.pdf).

- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). *Ecosystem and human well-being*. Island Press. doi:10.1196/annals.1439.003.
- Miltenyi Biotec, Invitrogen, LifeSciences, Serum, Foetal Bovine, Côrtes, Luzia Mc, Silva, Roger Mm, ... Ma, Tao. (2010). *Cell Culture Basics Handbook. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* (Vol. 45). doi:10.1007/s11626-009-9197-2.
- Morantes, Sandra, Perdomo, Sandra, Carrillo, Edward, y Aristizábal, Fabio. (2013). *Caracterización del perfil quimiosensibilidad y del estado de ampliación génica de un panel de líneas celulares de origen tumoral pulmonar*. Revista Colombiana de Biotecnología, 15(1), 42-51.
- National Cancer Institute. (2014). *Todo lo que usted necesita saber sobre el cáncer de pulmón*.
- Oelkrug, Christopher, Hartke, Martin, y Schubert, Andreas. (2015). Mode of action of anticancer peptides (ACPs) from amphibian origin. *Anticancer Research*, 35(2), 635-643.
- Ohsaki, Y., Gazdar, a F., Chen, H. C., y Johnson, B. E. (1992). Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Res*, 52, 3534-3538. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319823>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (s. f.). Servicios ecosistémicos y biodiversidad. Recuperado el 23 de febrero de 2018 de: <http://www.fao.org/ecosystem-services-biodiversity/background/regulating-services/es>
- Organización Mundial de la Salud. (2017a). Resistencia a los antibióticos. World Health Organization. Recuperado el 8 de febrero de 2018 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>.
- Organización Mundial de la Salud. (2017b). Resistencia a los antimicrobianos. World Health Organization. Recuperado el 8 de febrero de 2018 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.
- Papo, Niv, y Shai, Yechiel. (2003). Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides*, 24(11), 1693-1703. doi:10.1016/j.peptides.2003.09.013.
- Peloso, Pedro L. V., Orrico, Victor G. D., Haddad, Célio F. B., Lima-Filho, Geraldo R., y Sturaro, Marcelo J. (2016). A New Species of Clown Tree Frog, *Dendropsophus leucophyllatus* Species Group, from Amazonia (Anura, Hylidae). *South American Journal of Herpetology*, 11(1), 66-80. doi:10.2994/SAJH.
- Proaño-Bolaños, Carolina, Zhou, Mei, Wang, Lei, Coloma, Luis A., Chen, Tianbao, y Shaw, Chris. (2016). Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyla calcarifer*. *Journal of Proteomics*, 146, 1-13. doi:10.1016/j.jprot.2016.06.017.

- Proaño, Carolina. (2004). *Ocurrencia de compuestos antimicrobianos en la piel de 21 especies de anfibios (ANURA: Hylidae, Dendrobatidae Ranidae) y purificación parcial de 5 péptidos antimicrobiales de Agalychnis litodryas (Hylidae)*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Rollins-Smith, Louise A., Doersam, Jennifer K., Longcore, Joyce E., Taylor, Sharon K., Shamblin, Jessica C., Carey, Cynthia, y Zasloff, Michael A. (2002). Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Developmental & Comparative Immunology*, 26(1), 63-72. doi:10.1016/S0145-305X(01)00041-6.
- Rollins-Smith, Louise A., King, Jay D., Nielsen, Per F., Sonnevend, Agnes, y Conlon, J. Michael. (2005). An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). *Regulatory Peptides*, 124(1-3), 173-178. doi:10.1016/j.regpep.2004.07.013.
- Schad, K. (2008). Amphibian Population Management Guidelines. *Amphibian Ark Amphibian Population Management Workshop*, 31.
- Sigma. (2008). Fundamental Techniques in Cell Culture. *SIGMA Laboratories*, 1-61. doi:10.1016/j.cell.2011.04.001.
- Simmaco, M., Mignogna, G., y Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: What do they tell us? *Biopolymers - Peptide Science Section*, 47(6), 435-450. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<435::AID-BIP3>3.0.CO;2-8.
- Sirard, Tom. (2012). Fundamentals of HPLC. *Waters Corporation*. Recuperado el 8 de marzo de 2018 de: http://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLCWebinar_TRS_102012.pdf.
- Skoog, Douglas A., Holler, James F., y Crouch, Stanley R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. CENGAGE Learning (Sexta., Vol. 53). D.F. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Smart Bioscience. (2016). Peptide handling & storage guidelines. Recuperado el 30 de mayo de 2018 de: <https://www.smart-bioscience.com/support/handling-storage/>.
- Snyder, Lloyd R., Kirkland, Joseph J., y Dolan, John W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography. Materials Technology* (Third.). New Jersey: A John Wiley & Sons, Inc. Recuperado de: http://197.14.51.10:81/pmb/BIOLOGIE/0470167548_Chromatography.pdf.
- Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Quito. (2014). *Registro Nacional De Tumores / National Cancer Registry*. Quito. Recuperado de: <http://www.estadisticas.med.ec/Publicaciones/PUBLICACION-QU-2006-2010.pdf>.
- Sok, Miha, Šentjurc, Marjeta, y Schara, Milan. (1999). Membrane fluidity characteristics of human lung cancer. *Cancer Letters*, 139(2), 215-220. doi:10.1016/S0304-3835(99)00044-0.

- Téllez, Germán Alberto, y Castaño, Jhon Carlos. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-67. doi:10.1016/S0123-9392(10)70093-X.
- Thermo Fisher Scientific. (2016). Gibco® Cell Culture Basics. Thermo Fisher Scientific Inc. Recuperado de: <http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html>.
- Tyler, Michael, Stone, David J., y Bowie, John H. (1992). A novel method for the release and collection of dermal, glandular secretions from the skin of frogs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 28(4), 199-200. doi:10.1016/1056-8719(92)90004-K.
- Vallejo, Guillermo. (2016). *Identificación de secreciones peptídicas de 15 especies de anuros amazónicos con actividad antimicrobiana y anticancerígena, y su aporte como servicio ecosistémico de tipo provisión*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Van Zoggel, Hanneke, Hamma-Kourbali, Yamina, Galanth, Cécile, Ladram, Ali, Nicolas, Pierre, Courty, José, ... Delbé, Jean. (2012). Antitumor and angiostatic peptides from frog skin secretions. *Amino Acids*, 42(1), 385-395. doi:10.1007/s00726-010-0815-9.
- Wang, Chi Chung, Lin, Sheng Yi, Lai, Yi Hua, Liu, Ya Jung, Hsu, Yuan Lin, y Chen, Jeremy J. W. (2012). Dimethyl sulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activator protein-1 activation in NSCLC cells. *PLoS ONE*, 7(4). doi:10.1371/journal.pone.0033772.
- Wang, Ran, Zhou, Yu, Chen, Tianbao, Zhou, Mei, Wang, Lei, y Shaw, Chris. (2015). Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the red-eye leaf frog, *agalychnis callidryas*. *International Journal of Biological Sciences*, 11(2), 209-219. doi:10.7150/ijbs.10143.
- Wang, Zhe, y Wang, Guangshun. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D590-2. doi:10.1093/nar/gkh025.
- Winship Cancer Institute. (2016). Cancer Quest. Recuperado el 11 de marzo de 2018 de: <https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/division-de-la-celula>.
- Wong, Martin C. S., Lao, Xiang Qian, Ho, Kin-Fai, Goggins, William B., y Tse, Shelly L. A. (2017). *Incidence and mortality of lung cancer: global trends and association with socioeconomic status*. *Nature* (Vol. 7). Springer US. doi:10.1038/s41598-017-14513-7.
- Woodhams, Douglas C., Ardipradja, K., Alford, R. A., Marantelli, G., Reinert, L. K., y Rollins-Smith, L. A. (2007). Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation*, 10(4), 409-417. doi:10.1111/j.1469-1795.2007.00130.x.
- Xu, Xueqing, y Lai, Ren. (2015). The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. *Chemical Reviews*, 115(4), 1760-1846. doi:10.1021/cr4006704.

10. FIGURAS

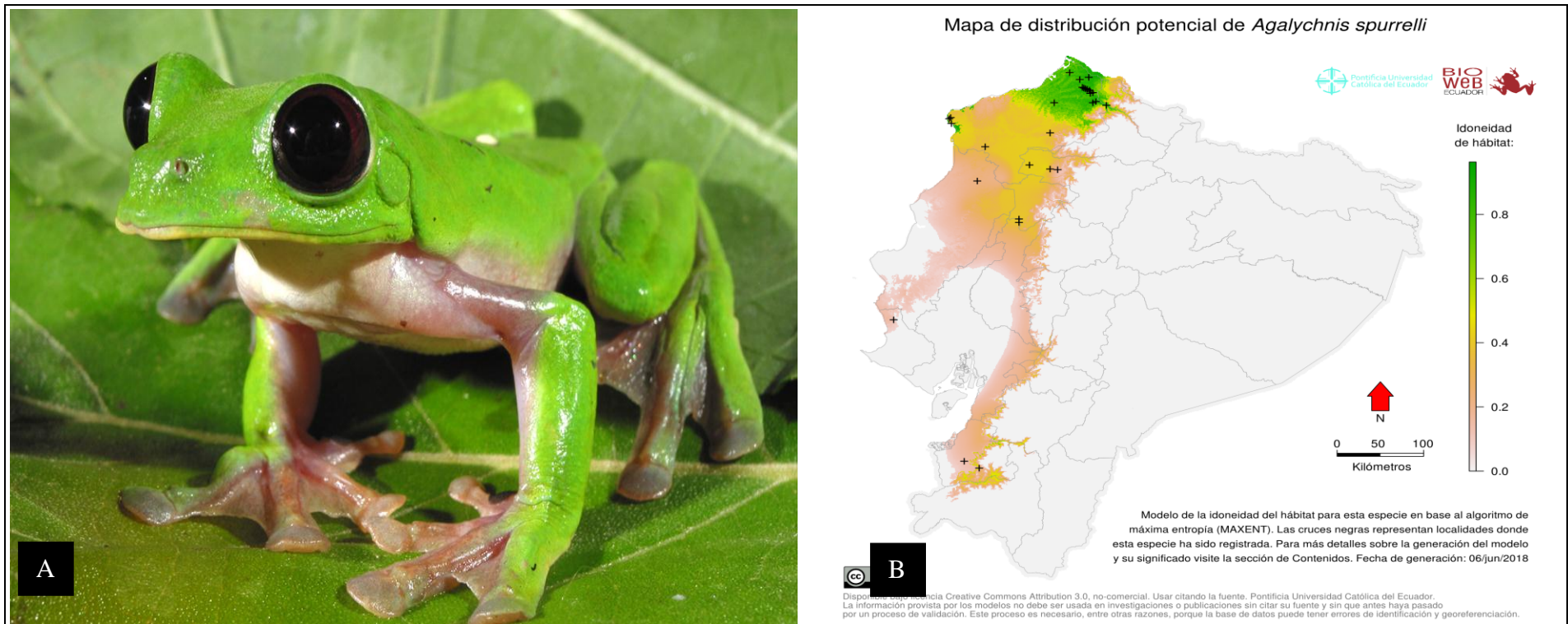


Foto: Santiago R. Ron. Tomado de: www.bioweb.bio

Foto: Santiago R. Ron. Tomado de: www.bioweb.bio

Figura 1. *Agalychnis spurrelli* y mapa de distribución potencial. A, *Agalychnis spurrelli*; B, Mapa de distribución potencial de *Agalychnis spurrelli*

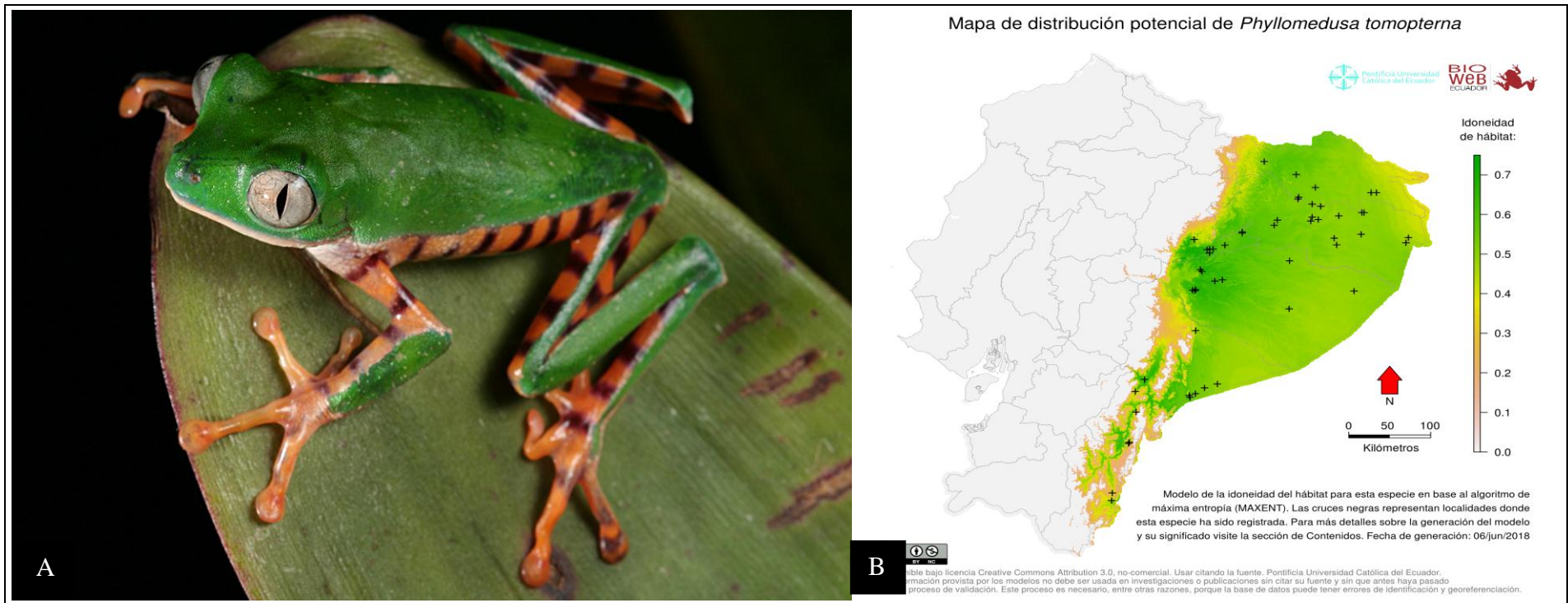


Foto: Santiago R. Ron. Tomado de: www.bioweb.bio

Foto: Santiago R. Ron. Tomado de: www.bioweb.bio

Figura 2. *Phyllomedusa tomopterna* y mapa de distribución potencial. A, *Phyllomedusa tomopterna*; B, Mapa de distribución potencial de *Phyllomedusa tomopterna*.

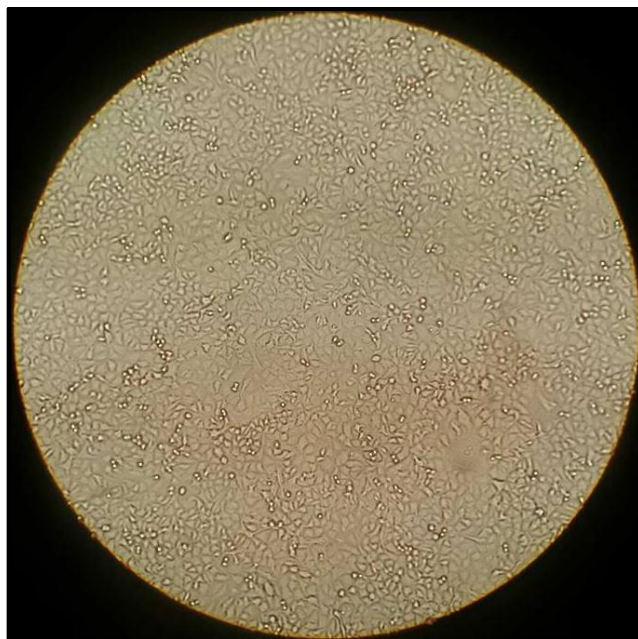


Figura 3. Células A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Las células pertenecen a la línea celular A549 ATCC®, se encuentran en confluencia del 95%.



Figura 4. Células A549 ATCC® disgregadas con tripsina-EDTA. Se observa en 10X.

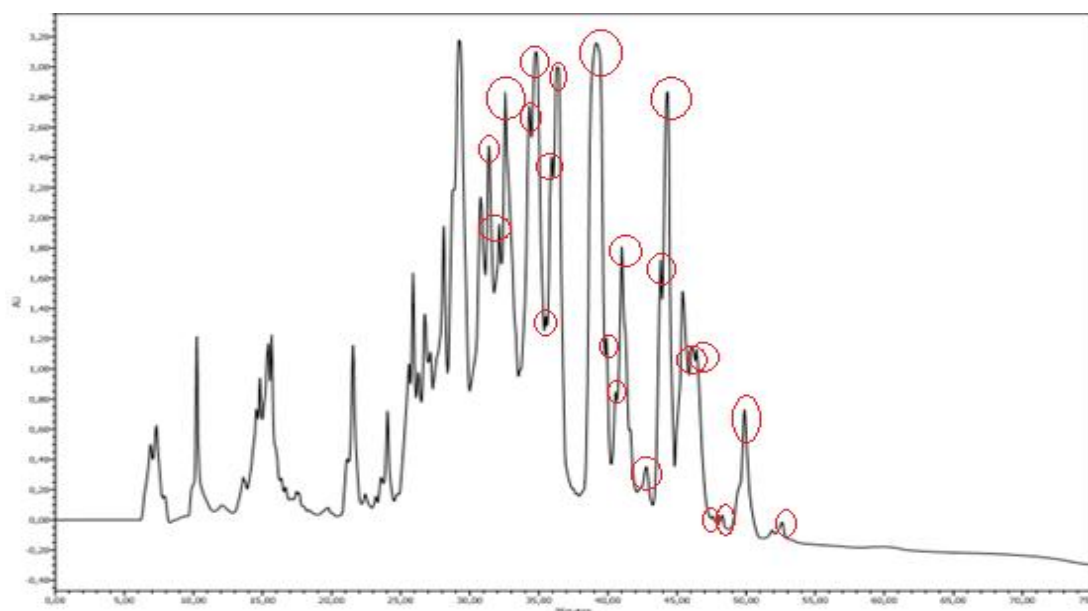


Figura 5. Cromatograma de *Agalychnis spurrelli*. Se observa el cromatograma obtenido mediante la técnica High Performance Liquid Chromatography (HPLC). La separación cromatográfica fue óptima debido a la utilización de una columna en óptimas condiciones.

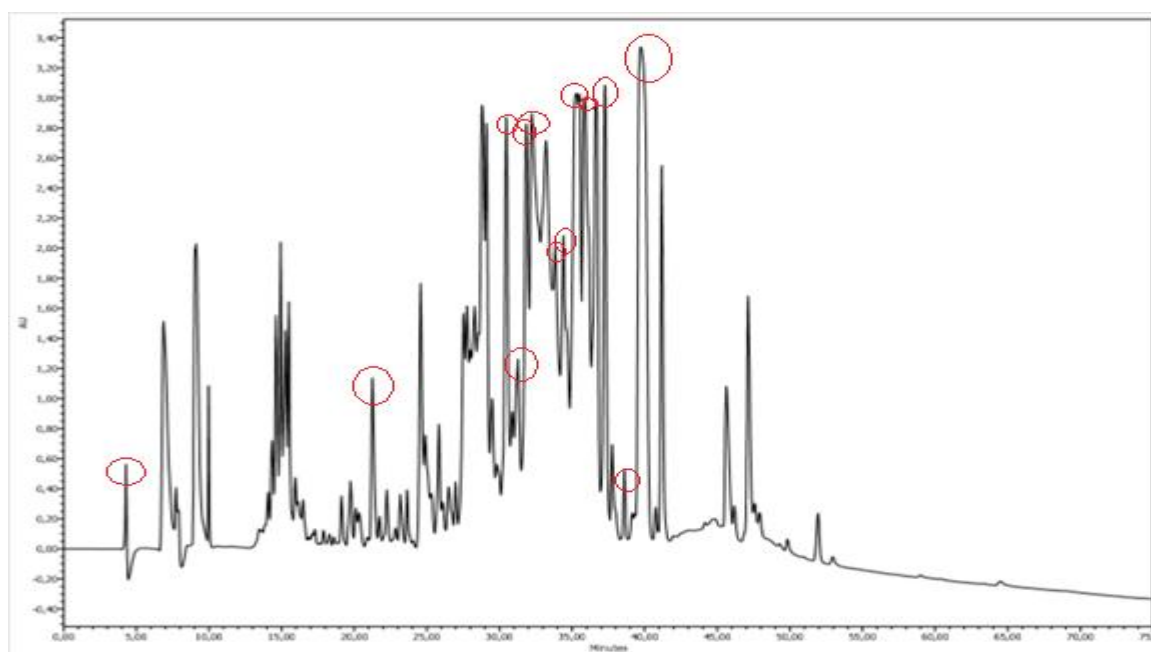


Figura 6. Cromatograma de *Phyllomedusa tomopterna*. Se observa el cromatograma obtenido mediante la técnica High Performance Liquid Chromatography (HPLC). La separación cromatográfica fue óptima debido a la utilización de una columna en óptimas condiciones.

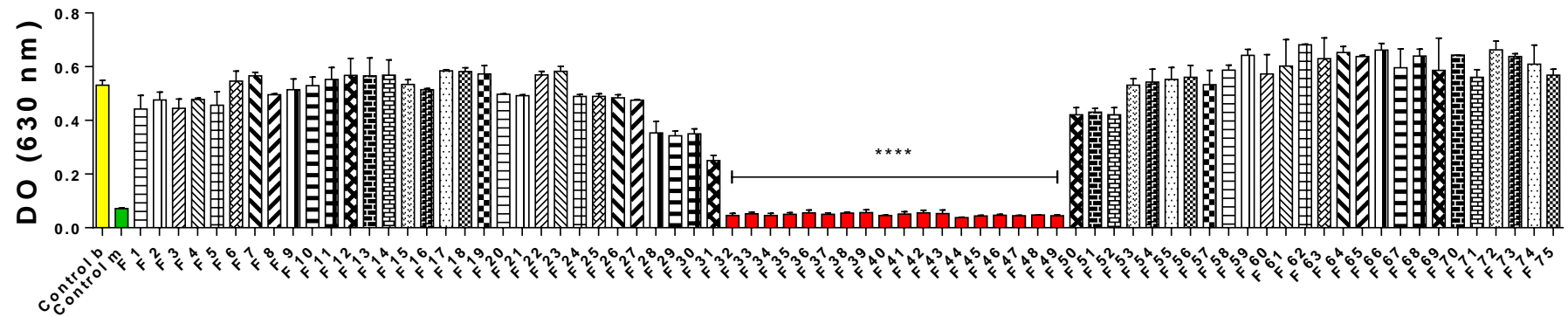


Figura 7. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 1, se observa el total de las fracciones analizadas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio). Las barras en blanco y negro representan a las fracciones sin actividad. En rojo, las fracciones que mostraron actividad.

****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$.

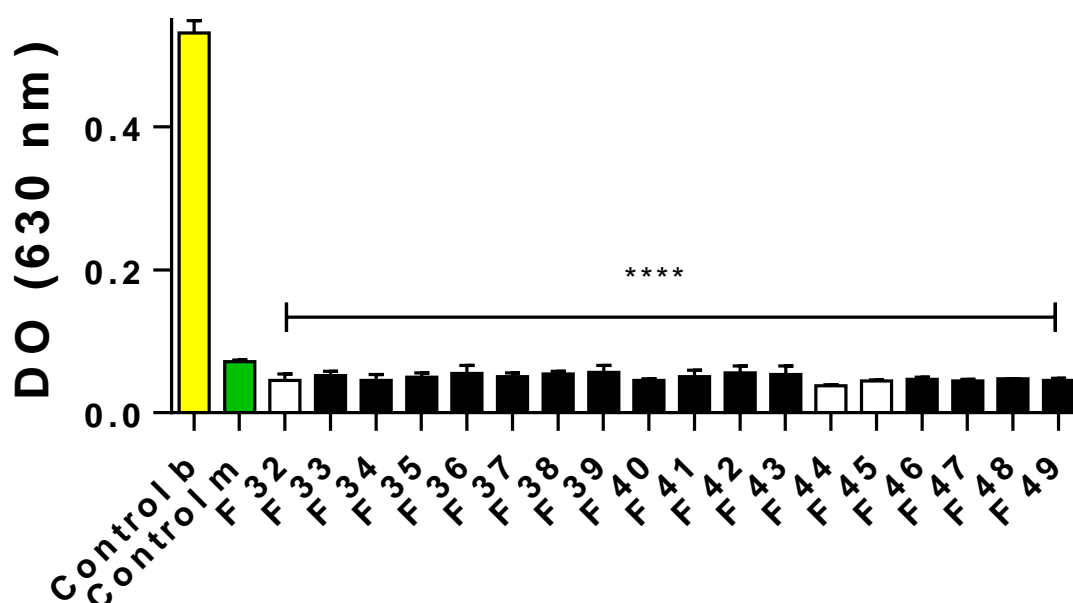


Figura 8. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 1, se observa las **fracciones activas**. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio); en blanco, las fracciones bacteriostáticas (F 32, F 44, F 45) y en negro, las fracciones con actividad bactericida (F 33 - F 43, F 46 - F 49).

****: $p < 0.0001$.

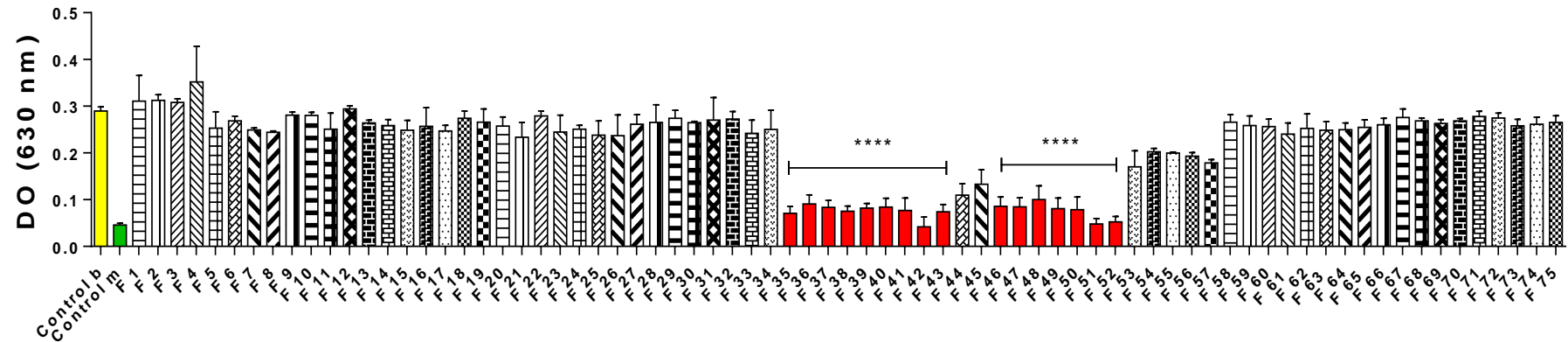


Figura 9. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 1, se observa el total de las fracciones analizadas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio). Las barras en blanco y negro representan a las fracciones sin actividad. En rojo, las fracciones que mostraron actividad.

****: $p < 0.0001$; *: $p = 0.123$.

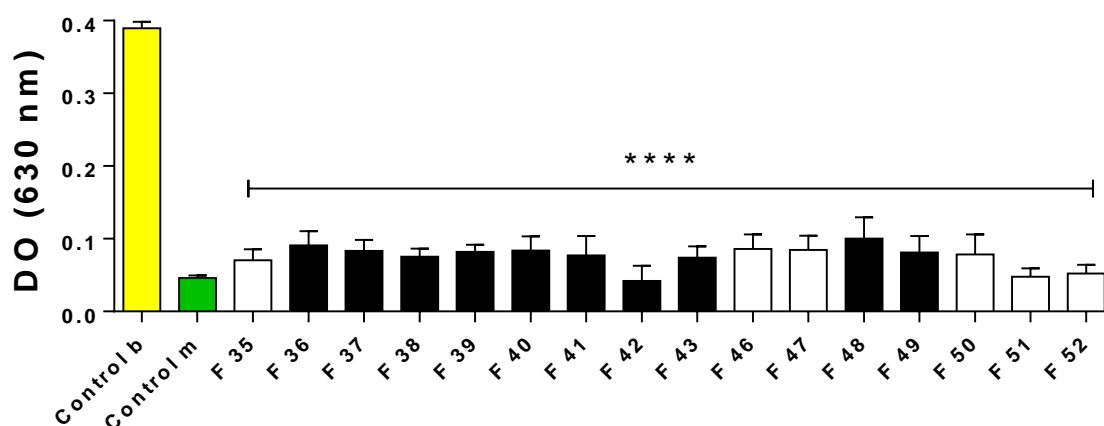


Figura 10. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 1, se observa las fracciones activas. En amarillo, el control positivo de crecimiento (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio); en blanco, las fracciones bacteriostáticas (F 35, F 46, F 47, F 50, F 51, F 52) y en negro, las fracciones con actividad bactericida (F 36 - F 43, F 48 – F 49).

****: $p < 0.0001$.

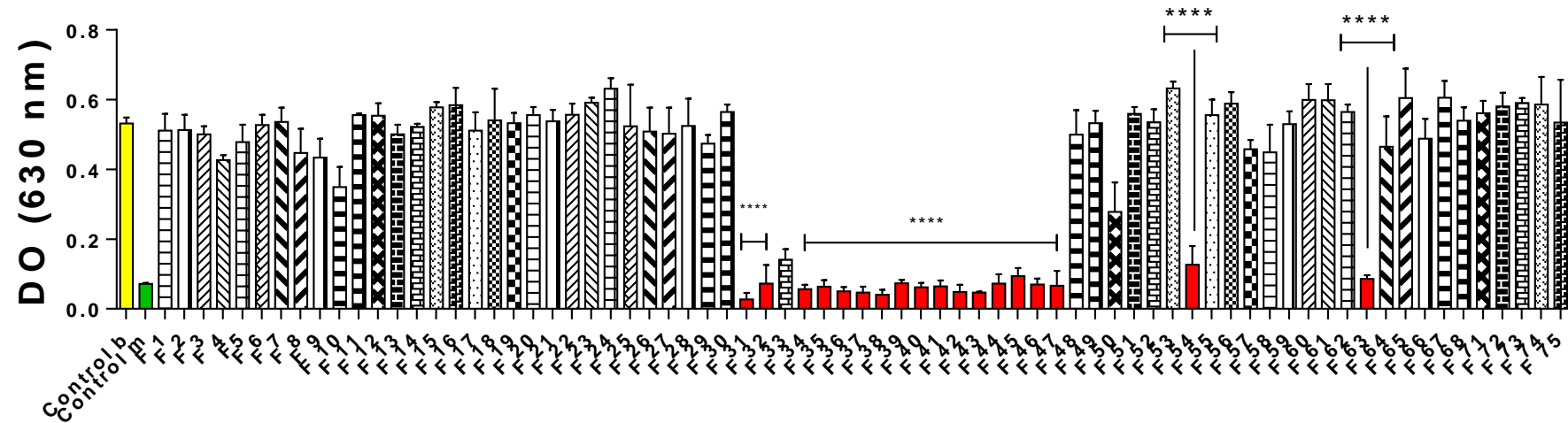


Figura 11. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 2, se observa el total de las fracciones analizadas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio). Las barras en blanco y negro representan a las fracciones sin actividad. En rojo, las fracciones que mostraron actividad.

****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$.

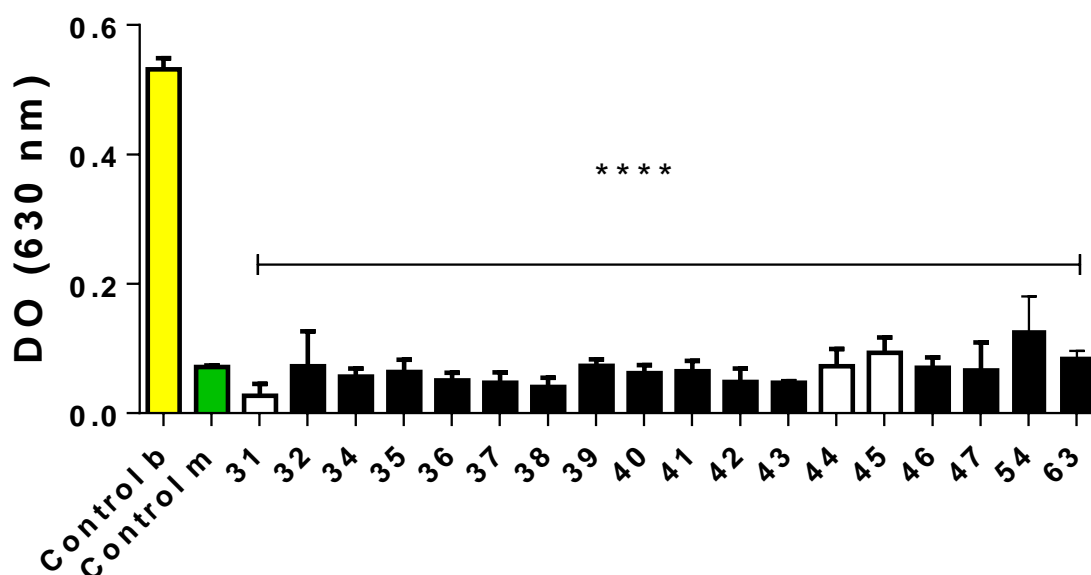


Figura 12. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 2, se observa las **fracciones activas**. En amarillo, el control positivo de crecimiento (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio); en blanco, las fracciones bacteriostáticas (F 31, F 44, F 45) y en negro, las fracciones con actividad bactericida (F 32, F 34 – F 43, F 46, F 47, F 54 y F 63).

****: $p < 0.0001$; ***: $p = 0.0001$.

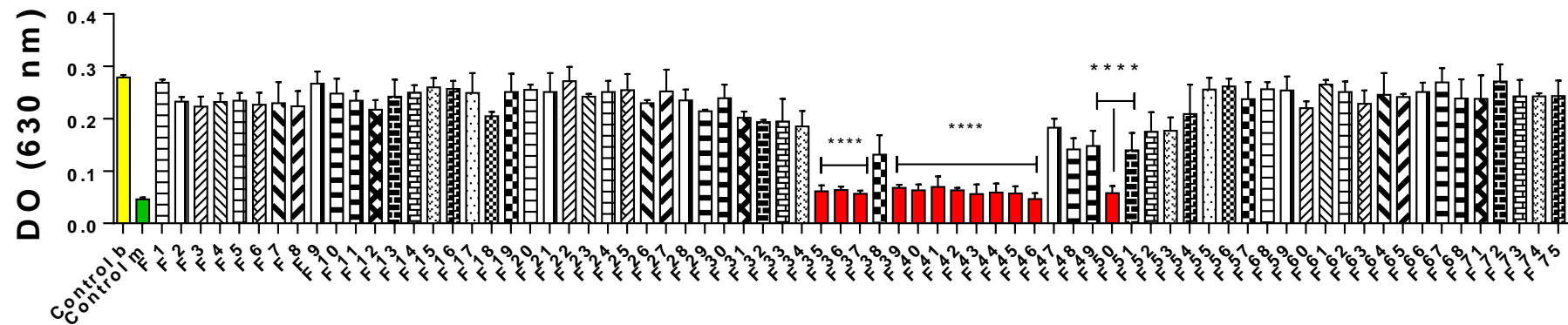


Figura 13. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 2, se observa el total de las fracciones analizadas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio). Las barras en blanco y negro representan a las fracciones sin actividad. En rojo, las fracciones que mostraron actividad.

****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$.

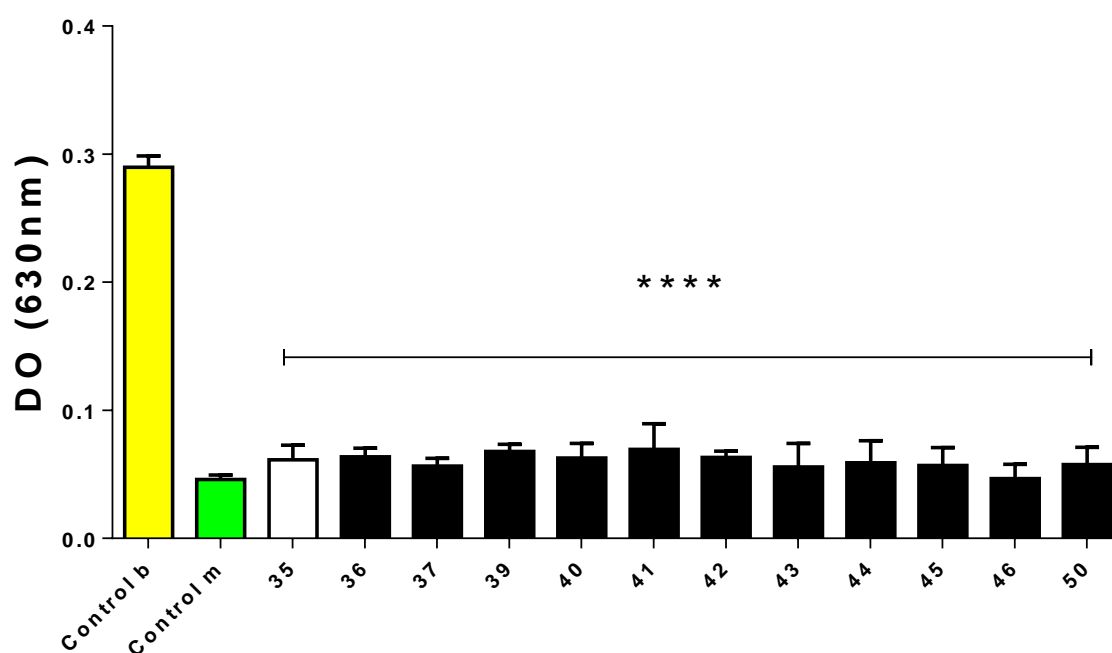


Figura 14. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 2, se observa las fracciones activas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio); en blanco, la fracción bacteriostática (F 35); en negro, las fracciones con actividad bactericida (F 36, F 37, F 39 - F 46 y F 50).

****: $p < 0.00001$; ***: $p = 0.0001$.

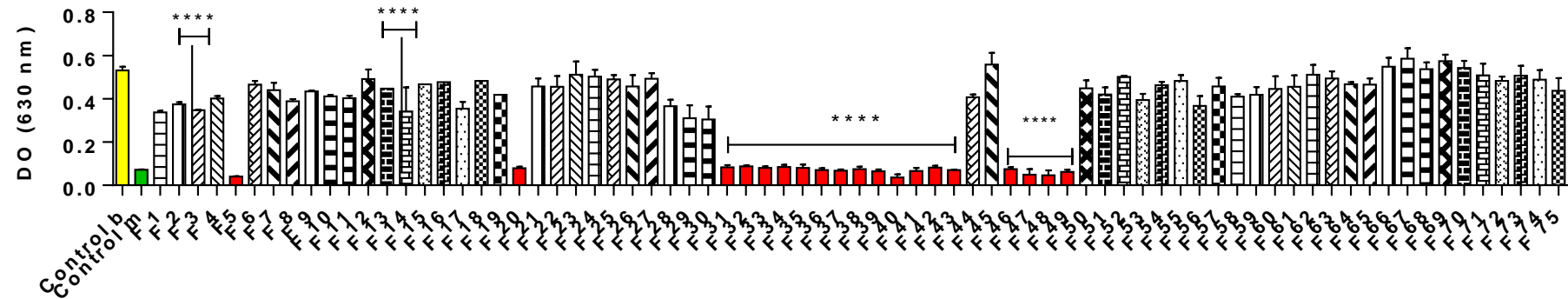


Figura 15. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 3, se observa el total de las fracciones analizadas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio). Las barras en blanco y negro representan a las fracciones sin actividad. En rojo, las fracciones que mostraron actividad.

****: $p < 0.0001$.

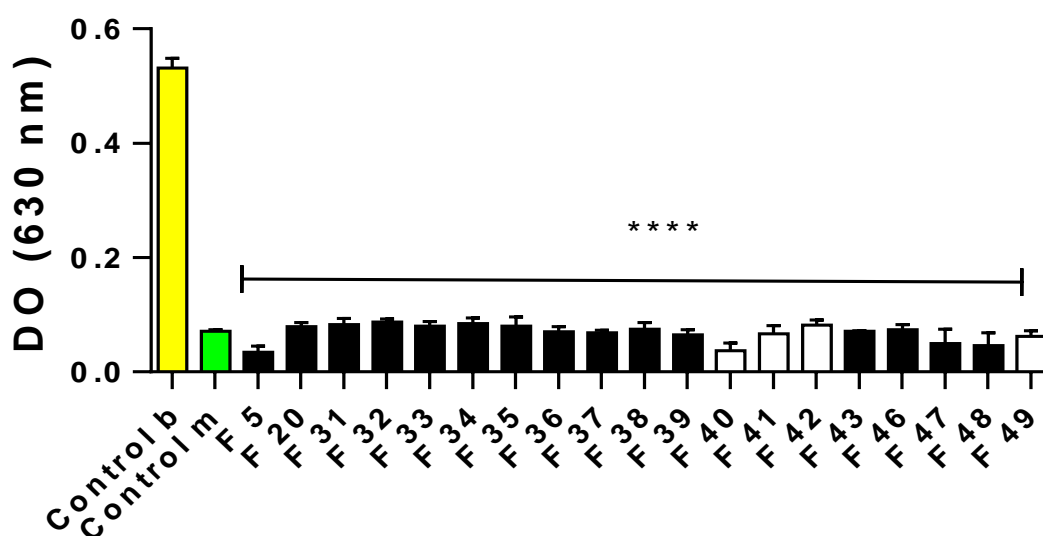


Figura 16. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC® con la muestra 3, se observa **las fracciones activas**. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio); en blanco, las fracciones bacteriostáticas (F 40, 41, 42 y 49) y en negro, las fracciones con actividad bactericida (F 5, F 20, F 31 - F 39, F 43, F 46 - F 48).

****: $p < 0.0001$.

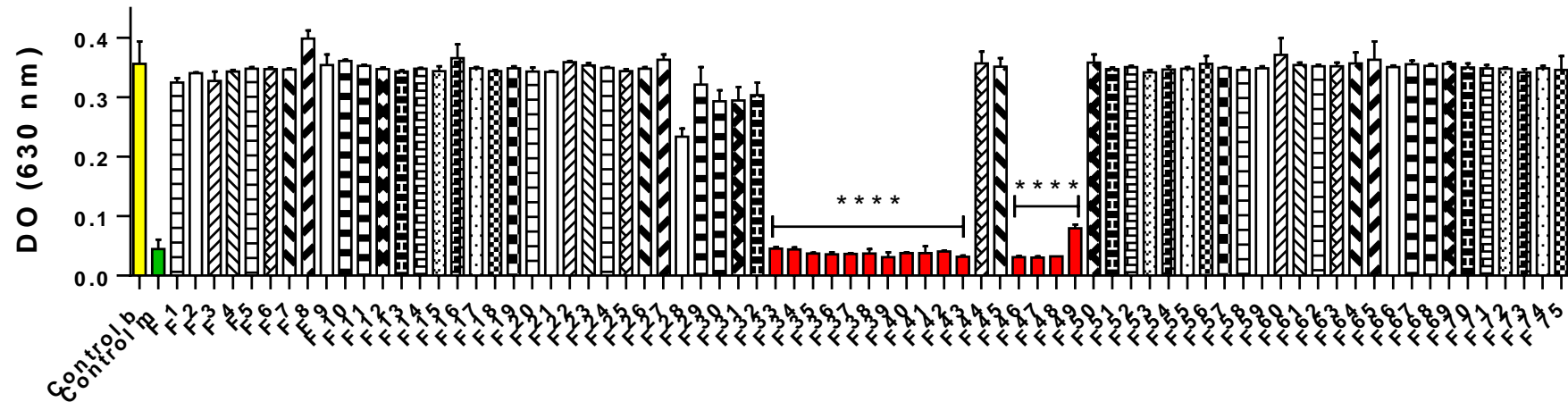


Figura 17. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 3, se observa el total de las fracciones analizadas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio). Las barras en blanco y negro representan a las fracciones sin actividad. En rojo, las fracciones que mostraron actividad.

****: $p < 0.0001$; ***: $p < 0.001$.

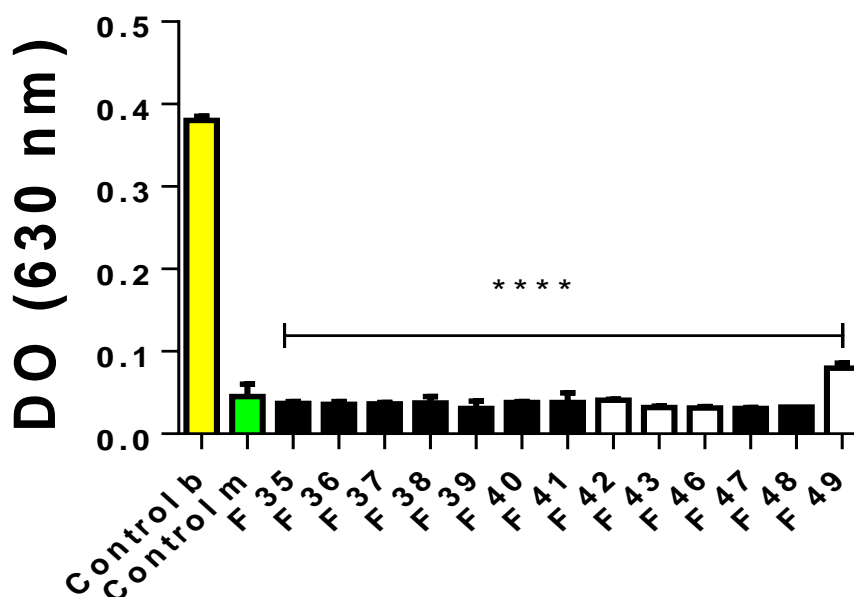


Figura 18. Actividad de las fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC® con la muestra 3, se observa las fracciones activas. En amarillo, el control de crecimiento positivo (200 µl de bacterias); en verde, el control negativo de crecimiento (200 µl de medio); en blanco, las fracciones bacteriostáticas (F 21, F 44, F 45) y en negro, las fracciones con actividad bactericida (F 33 – F 43, F 46 – F 49).

****: $p < 0.0001$.

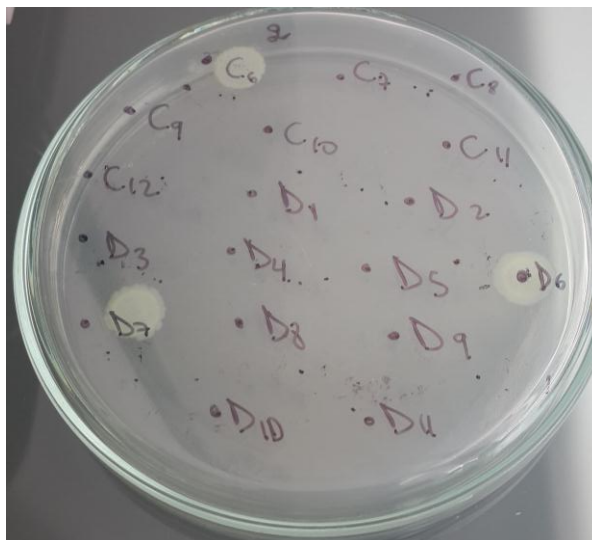


Figura 19. Detección de la actividad bactericida o bacteriostática de las fracciones bioactivas sobre *Escherichia coli*. En C1, D6 y D7 se observa crecimiento bacteriano; estas muestras fueron expuestas a fracciones bacteriostáticas. En aquellos puntos donde no se observa crecimiento bacteriano (C7-C12, D1-D5, D8-D11) es porque esas muestras fueron expuestas a fracciones bactericidas.

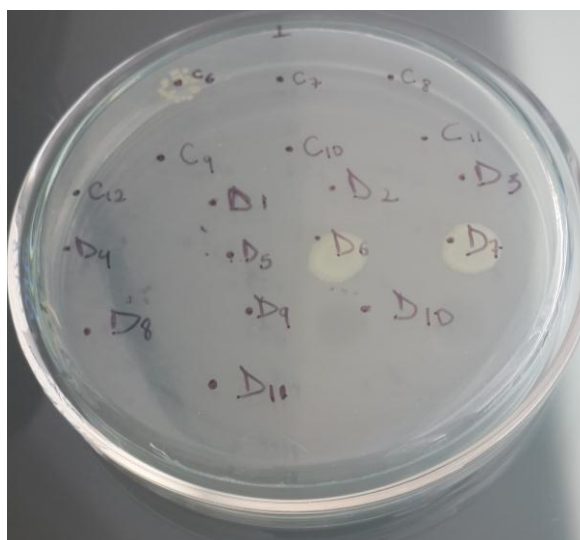


Figura 20. Detección de la actividad bactericida o bacteriostática de las fracciones bioactivas sobre *Staphylococcus aureus*. En C6, D6 y D7 se observa crecimiento bacteriano; estas muestras fueron expuestas a fracciones bacteriostáticas. En aquellos puntos donde no se observa crecimiento bacteriano (C7-C12, D1-D5, D8-D11) es porque esas muestras fueron expuestas a fracciones bactericidas.

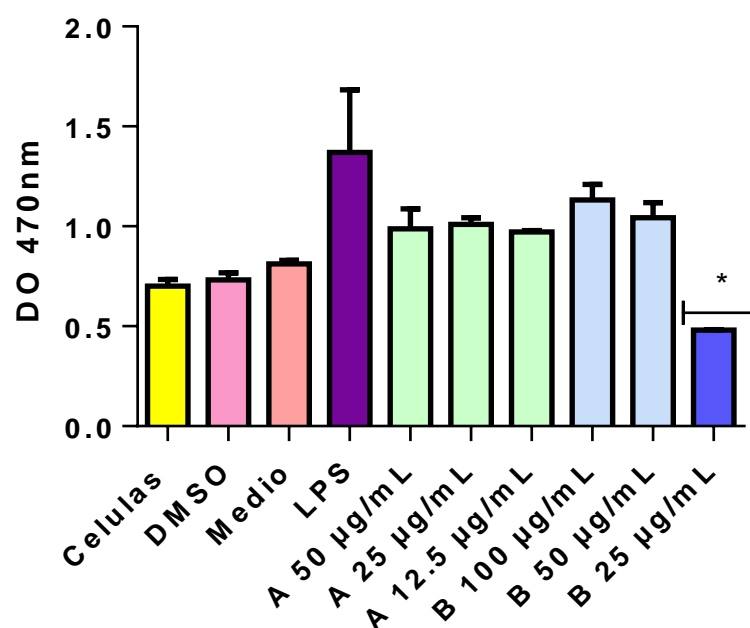


Figura 21. Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, **ensayo 1.** A, *Agalychnis spurrelli*; B, *Phyllomedusa tomopterna*; DMSO, dimetil sulfóxido; LPS, lipopolisacárido. La secreción cutánea total de la especie *Phyllomedusa tomopterna* en la concentración 25 µg/mL es efectiva contra la proliferación celular de la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.

*: $p > 0.05$

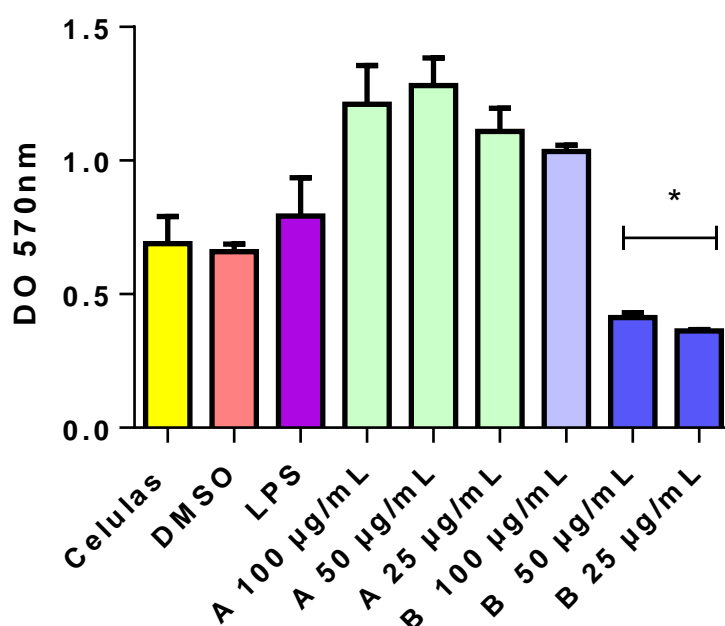


Figura 22. Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 2. A, *Agalychnis spurrelli*; B, *Phyllomedusa tomopterna*; DMSO, dimetil sulfóxido; LPS, lipopolisacárido. La secreción cutánea total de la especie *Phyllomedusa tomopterna* en las concentraciones 50 µg/mL y 25 µg/mL es efectiva contra la proliferación celular de la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.

*: $p > 0.05$

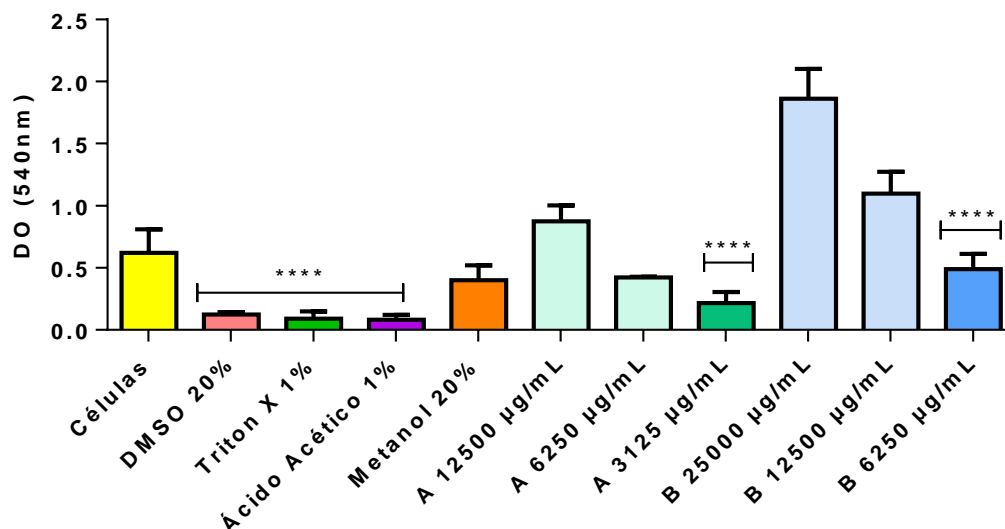


Figura 23. Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 3. A, *Agalychnis spurrelli*; B, *Phyllomedusa tomopterna*; DMSO, dimetil sulfóxido. La secreción cutánea total de las especies *Agalychnis spurrelli* en la concentración 3125 µg/mL y la de *Phyllomedusa tomopterna* en la concentración 6250 µg/mL es efectiva contra la proliferación celular de la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.

****: $p < 0.0001$

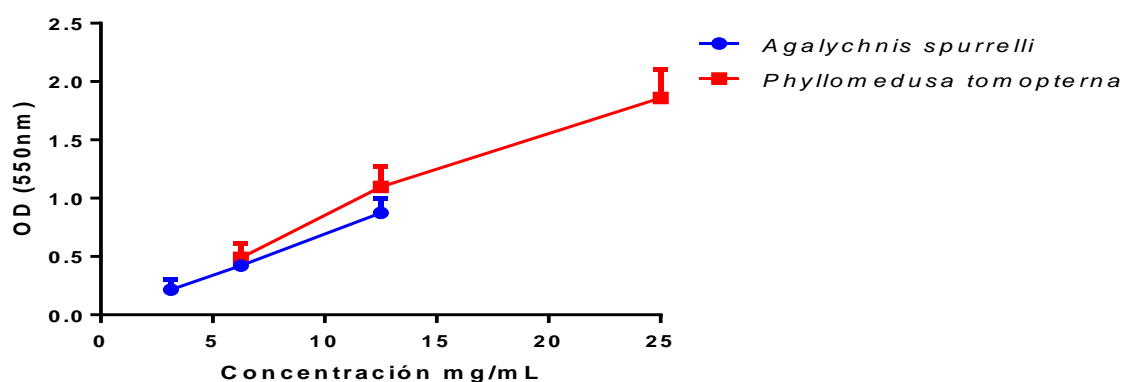


Figura 24. Curva de citotoxicidad, ensayo 3. Análisis con las concentraciones 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL y 3.125 mg/mL para *Agalychnis spurrelli* y concentraciones 25 mg/mL, 12.5 mg/mL y 6.25 mg/mL para *Phyllomedusa tomopterna*. La citotoxicidad de las dos especies es inversamente proporcional a la concentración de péptido.

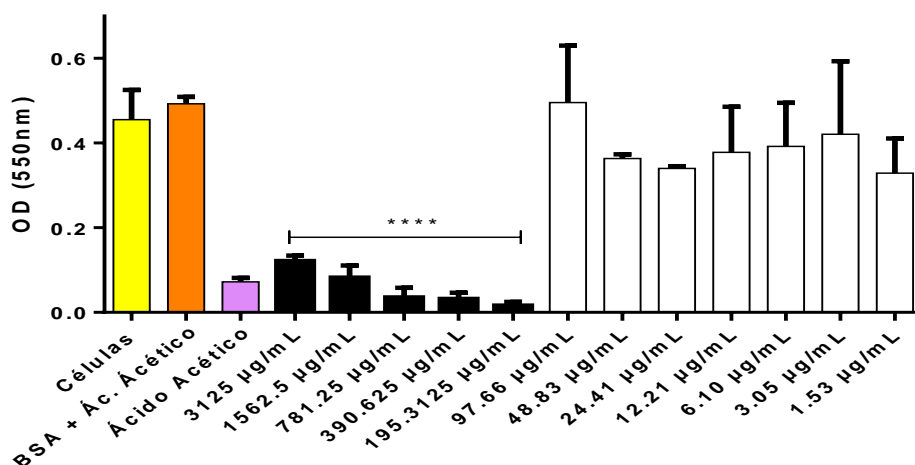


Figura 25. Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 4. Las barras en negro muestran que la secreción cutánea total es citotóxica desde los 3125 µg/mL hasta los 195.31 µg/mL, siendo estadísticamente significativos en comparación con las células sin tratamiento. Las barras blancas representan la ausencia del efecto citotóxico contra la línea celular.

****: $p < 0.0001$

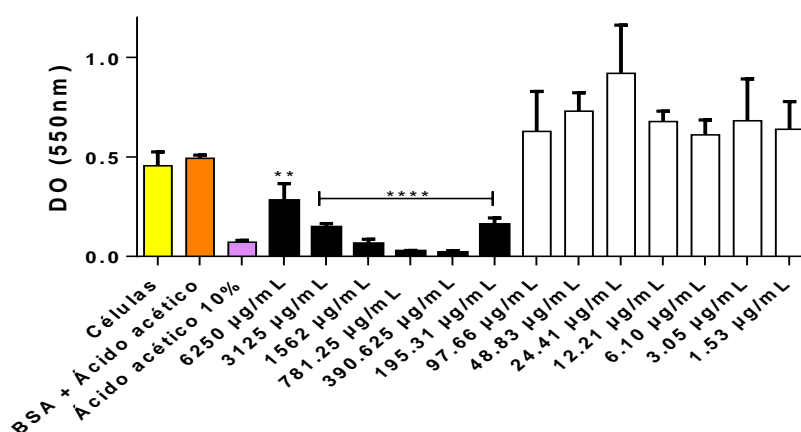


Figura 26. Citotoxicidad de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón, ensayo 4. Las barras en negro muestran que la secreción cutánea total es citotóxica desde los 6250 µg/mL hasta los 195.31 µg/mL, siendo estadísticamente significativos en comparación con las células sin tratamiento. Las barras blancas muestran la ausencia del efecto citotóxico contra la línea celular.

****: $p < 0.0001$; **: $p < 0.01$.

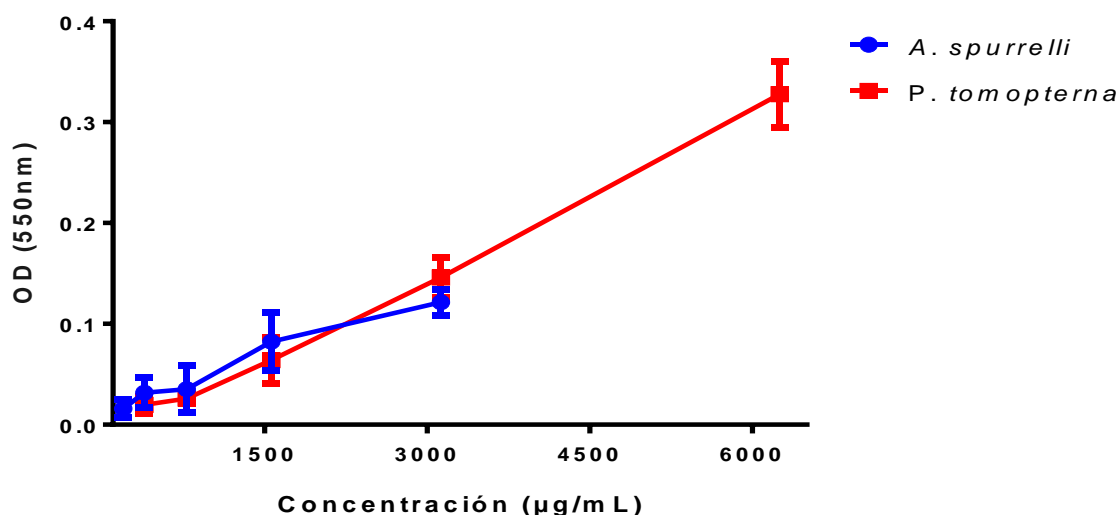


Figura 27. Curva de citotoxicidad, ensayo 4. Análisis con las concentraciones, 3125 µg/mL, 1562 µg/mL, 781.250 µg/mL, 390.625 µg/mL y 195.310 µg/mL para *Agalychnis spurrelli* y concentraciones 6250 µg/mL, 3125 µg/mL, 1562 µg/mL, 781.250 µg/mL y 390.625 µg/mL para *Phyllomedusa tomodopterna*. La citotoxicidad de la secreción de las dos especies es inversamente proporcional a su concentración, es decir, la muerte celular aumenta al disminuir la concentración de la secreción cutánea.

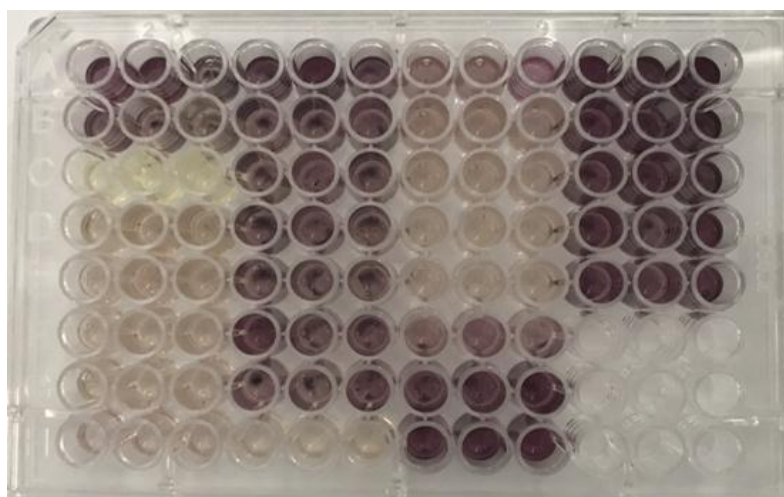
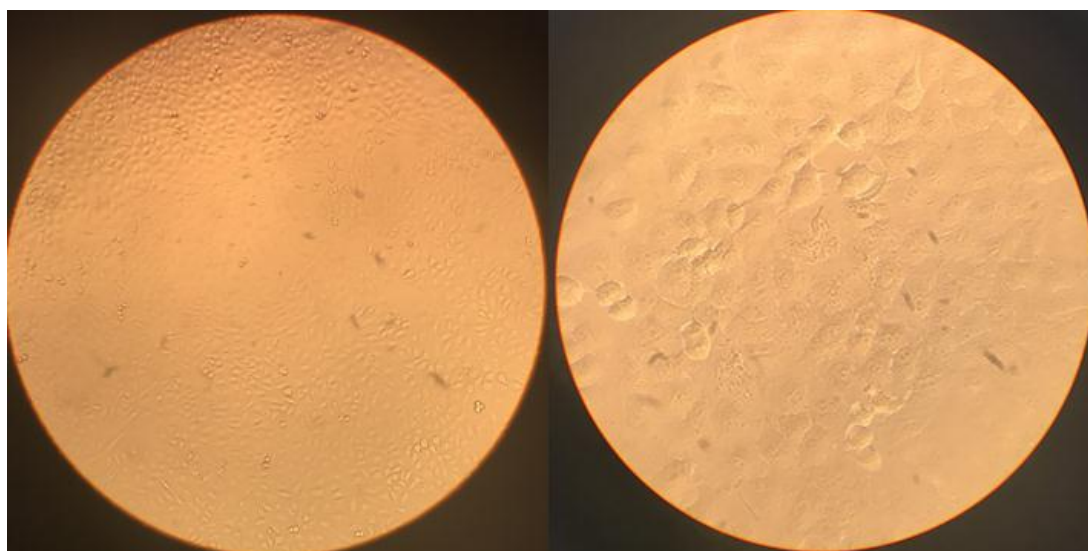


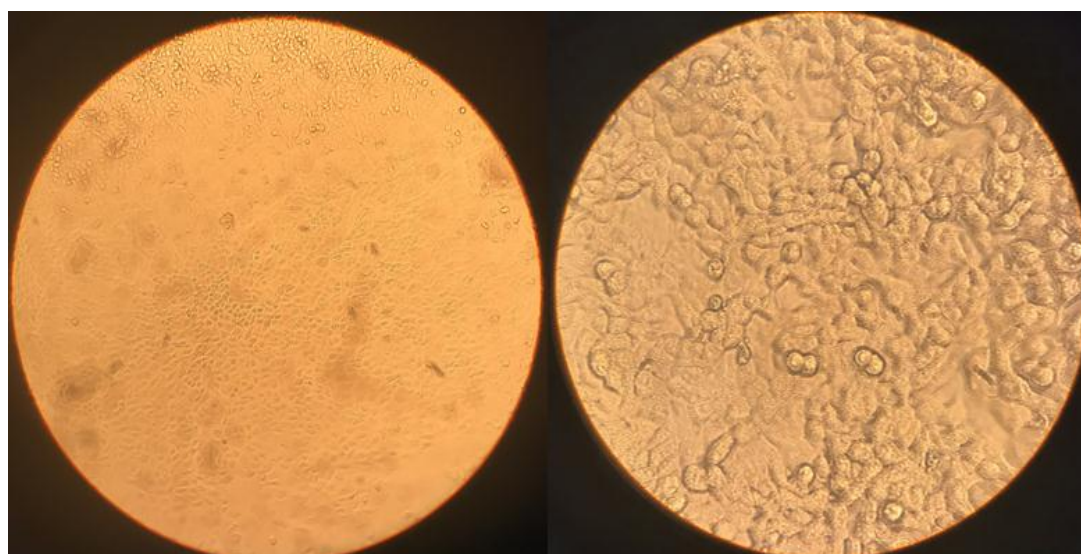
Figura 28. Actividad anticancerígena de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomodopterna* mediante ensayos de citotoxicidad con MTT. Los pocillos teñidos de morado muestran la inactividad de la secreción total y los pocillos transparentes evidencian la actividad de la secreción total sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.



Células A549 ATCC® 10X

Células A549 ATCC® 40X

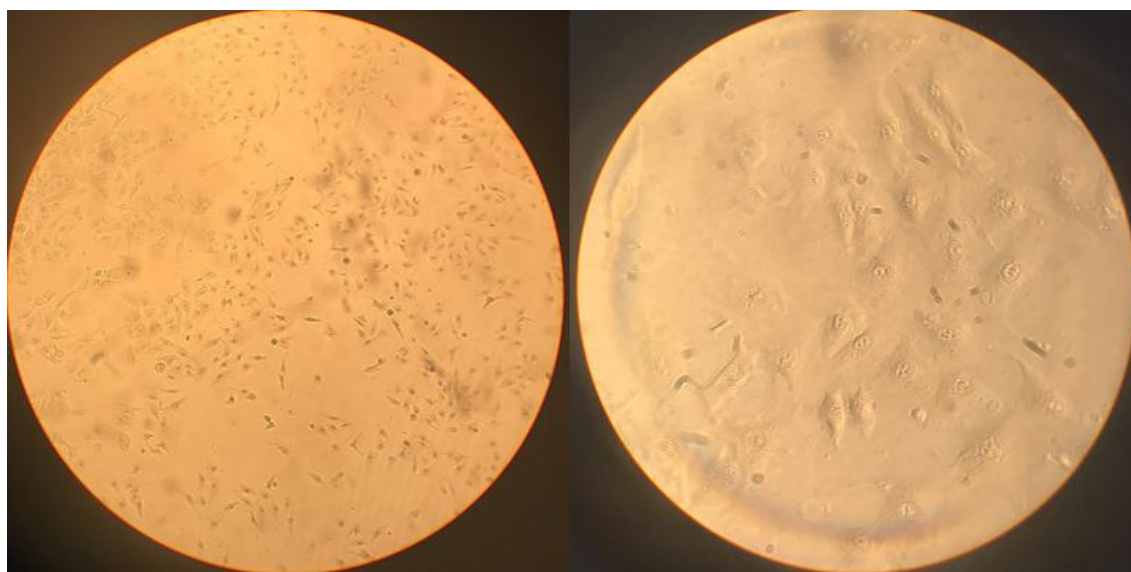
Figura 29. Células A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa a las células control después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.



BSA + ácido acético 10X

BSA + ácido acético 40X

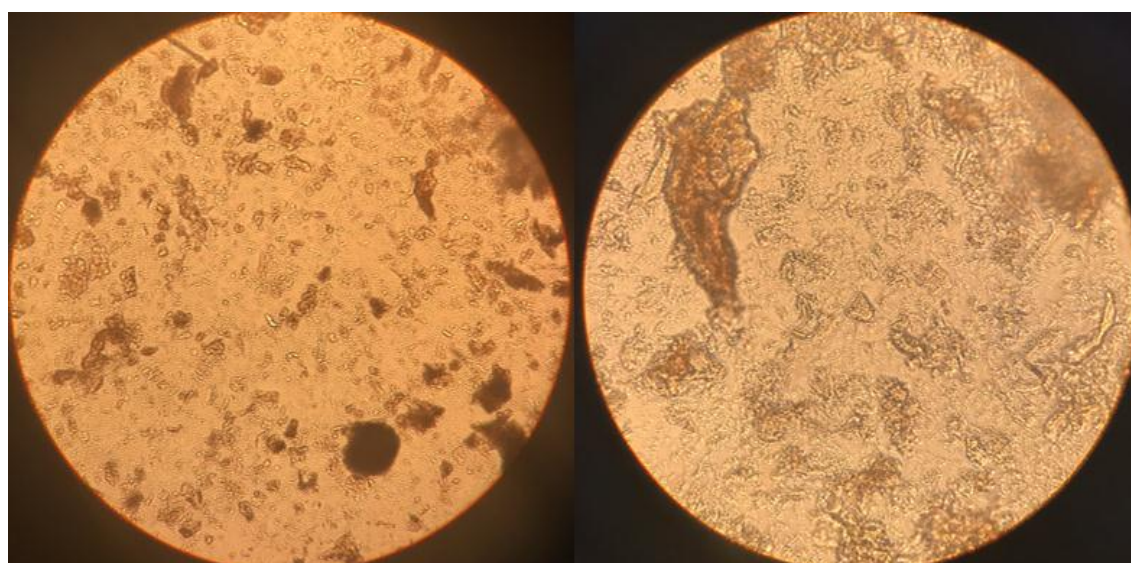
Figura 30. Efecto de BSA + ácido acético sobre las células A549 ATCC®. Se observa efecto del BSA 0.2% + ácido acético 0.01% (solvente empleado sobre las fracciones obtenidas por HPLC) a las 24 horas, sobre las células de cáncer de pulmón. Se observa con aumento de 10X y 40X.



Ácido acético 10X

Ácido acético 40X

Figura 31. Efecto del ácido acético al 10% sobre las células A549 ATCC®. Se observa el efecto del ácido acético al 10 % (control positivo de citotoxicidad) a las 24 horas, sobre las células de cáncer de pulmón. Se observa con aumento de 10X y 40X.



3125 µg/ mL 10X

3125 µg/ mL 40X

Figura 32. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 3125 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 3125 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

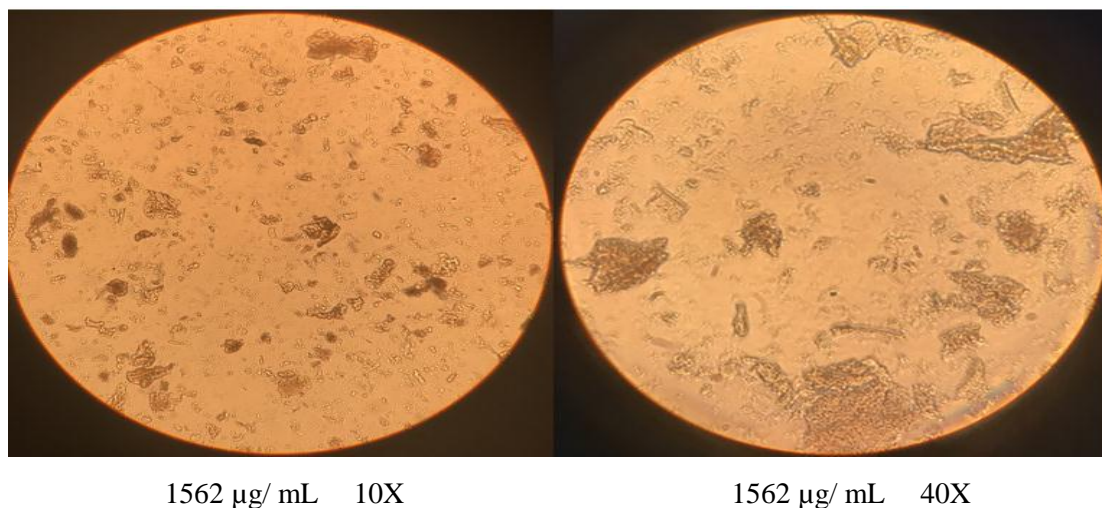


Figura 33. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 1562 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 1562 µg/ mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

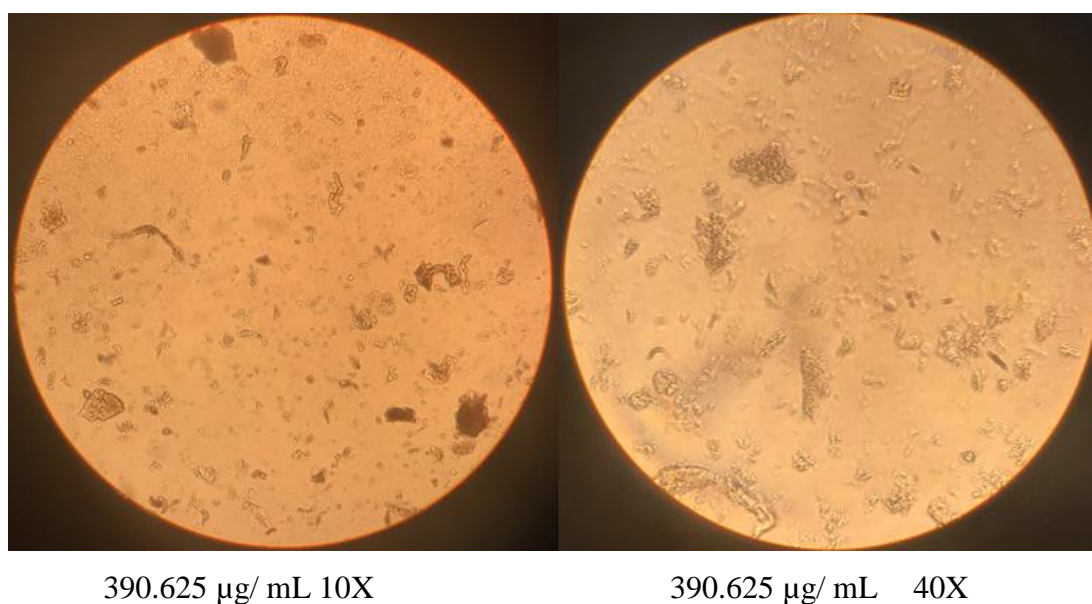


Figura 34. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 390.625 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración 390.625 µg/ mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

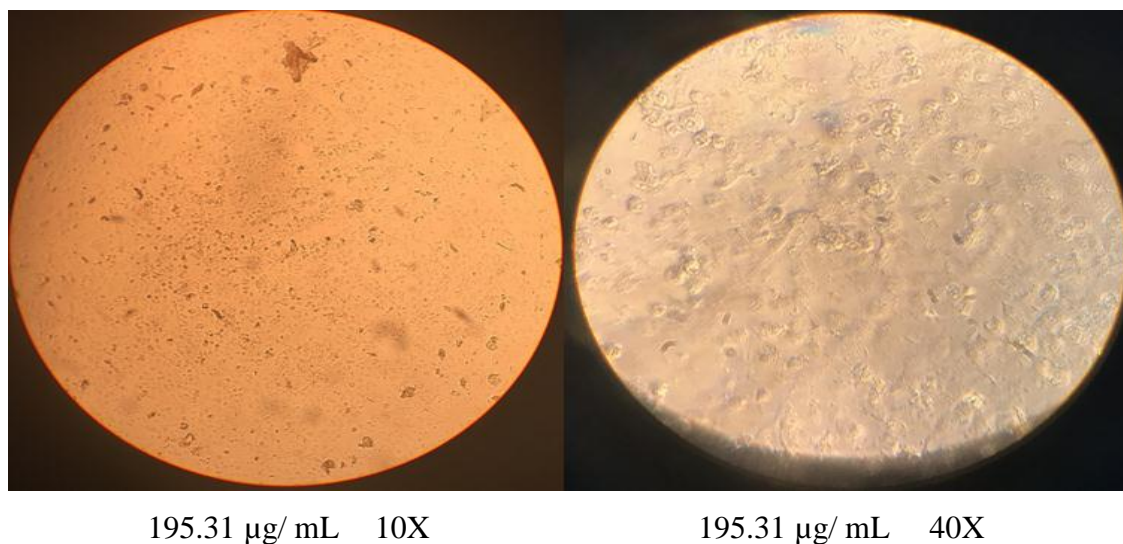


Figura 35. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 195.31 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración 195.31 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

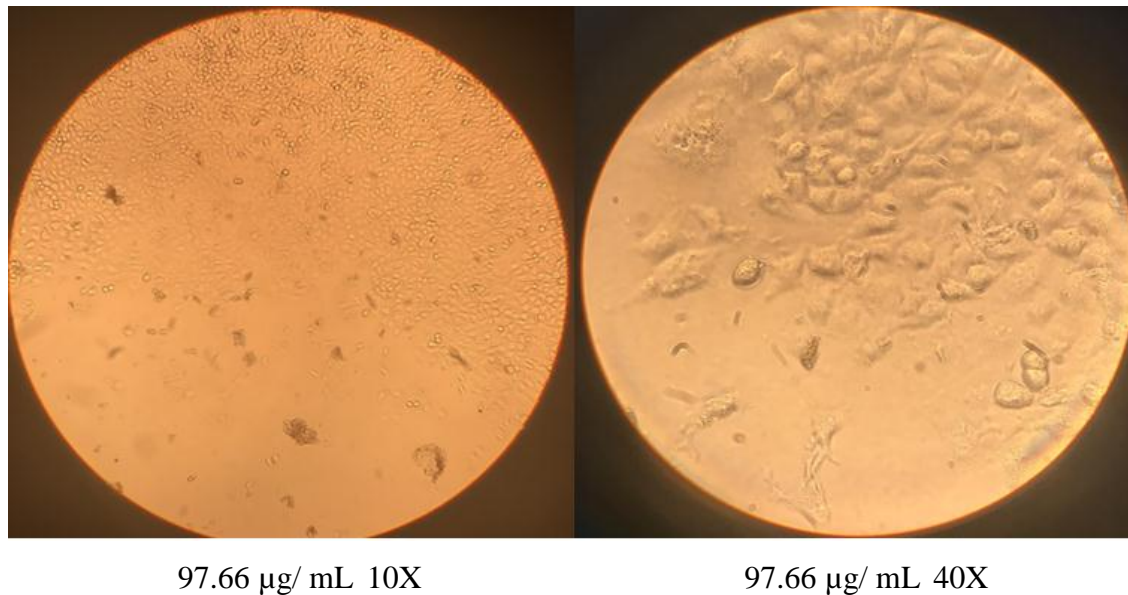


Figura 36. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 97.66 µg/ mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración 97.66 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

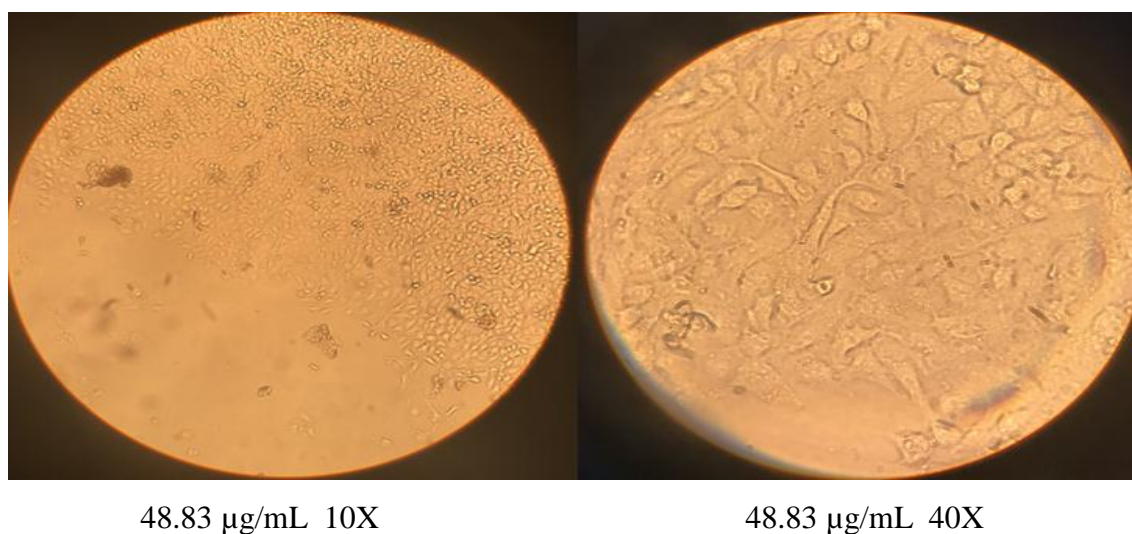


Figura 37. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 48.83 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 48.83 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

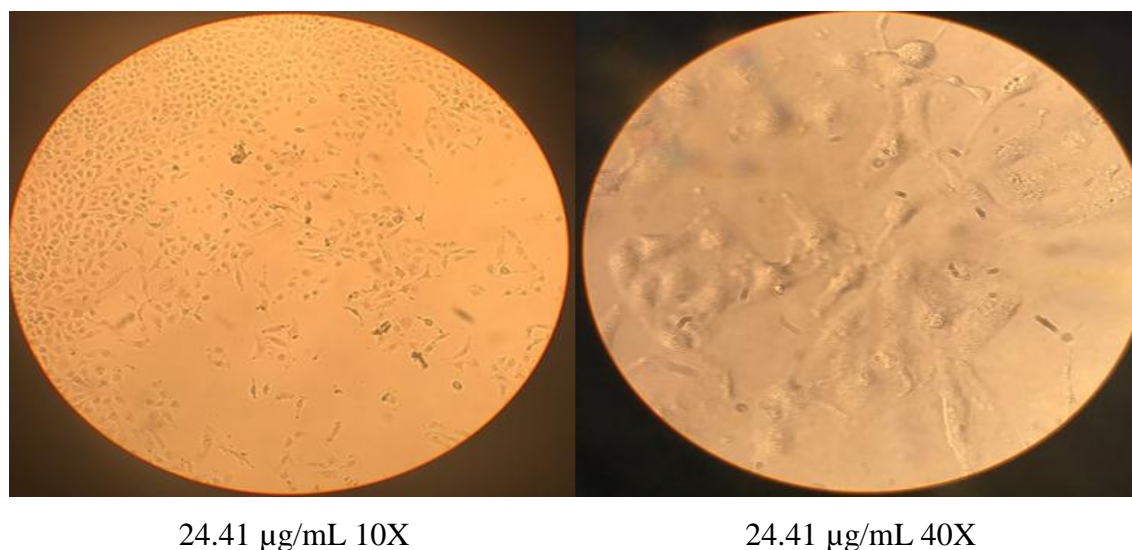


Figura 38. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 24.41 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 24.41 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

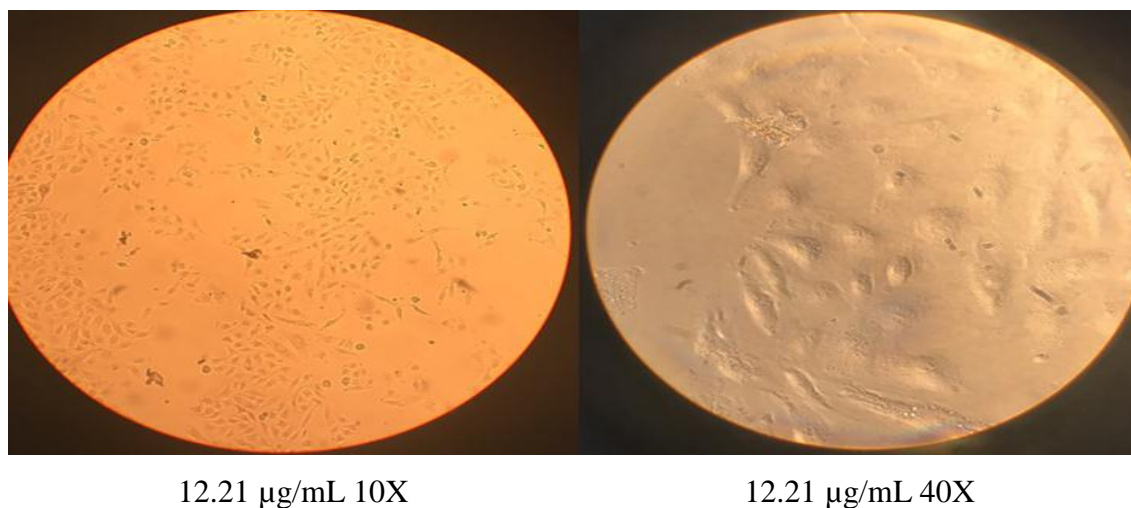


Figura 39. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 12.21 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 12.21 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

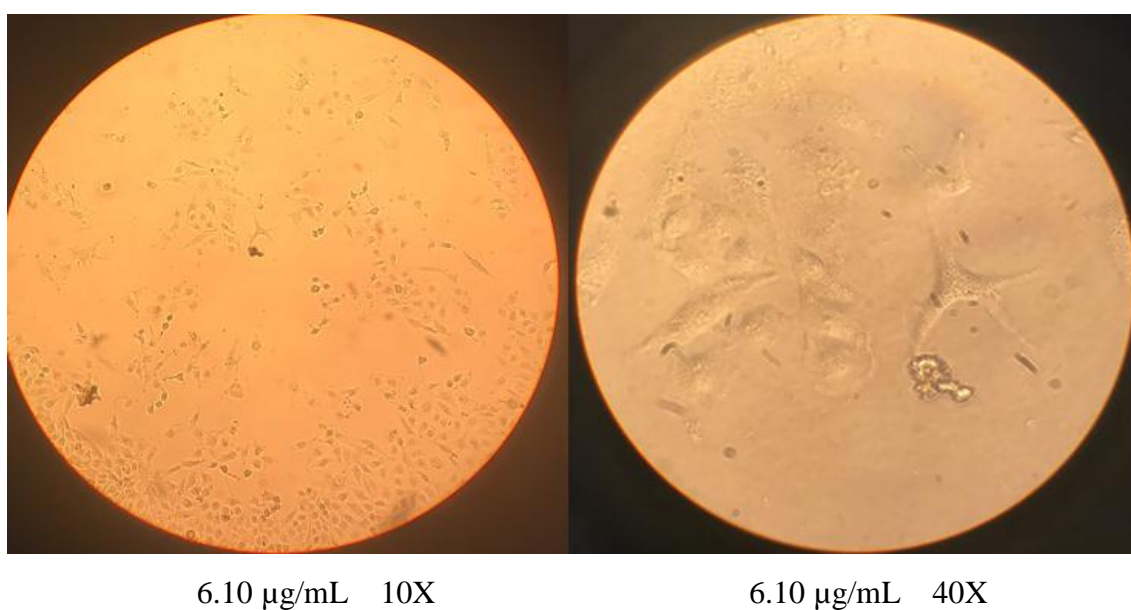


Figura 40. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 6.10 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 6.10 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

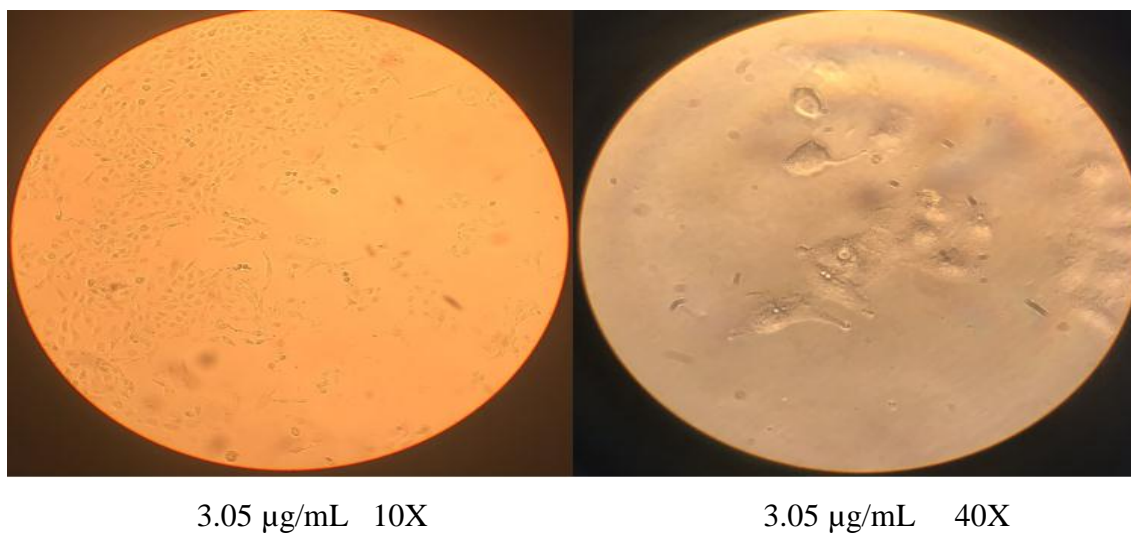


Figura 41. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 3.05 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 3.05 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

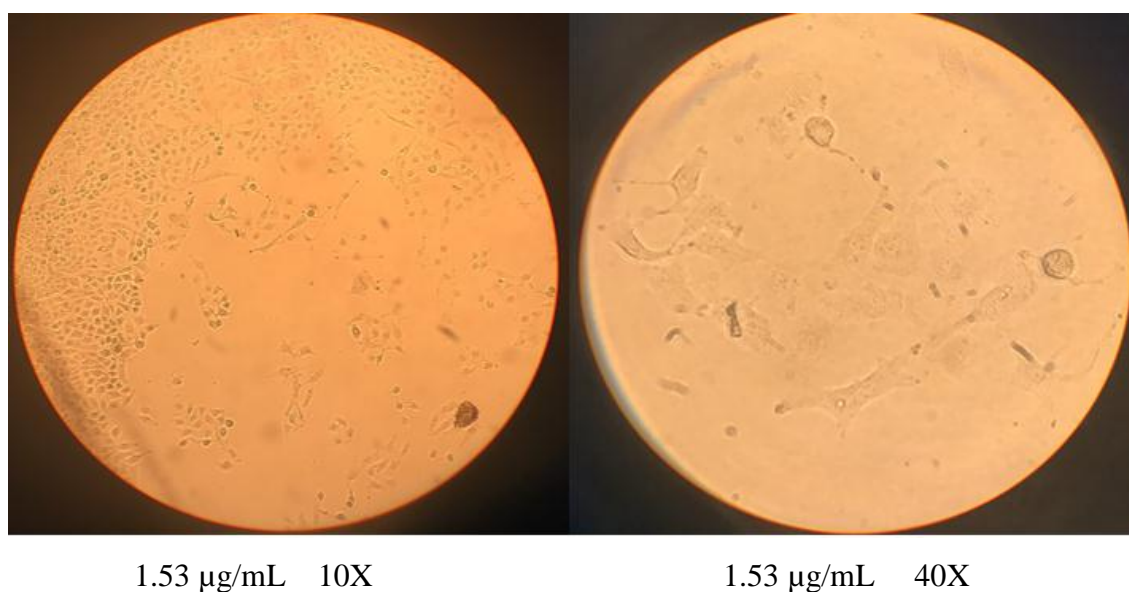


Figura 42. Efecto de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* a la concentración 1.53 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 1.53 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

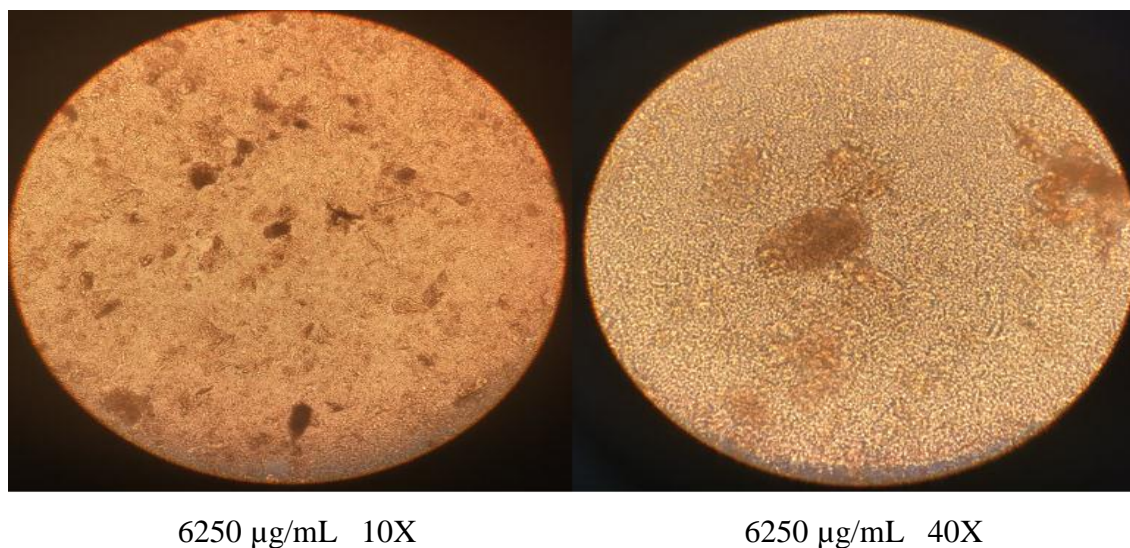


Figura 43. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 6250 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 6250 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

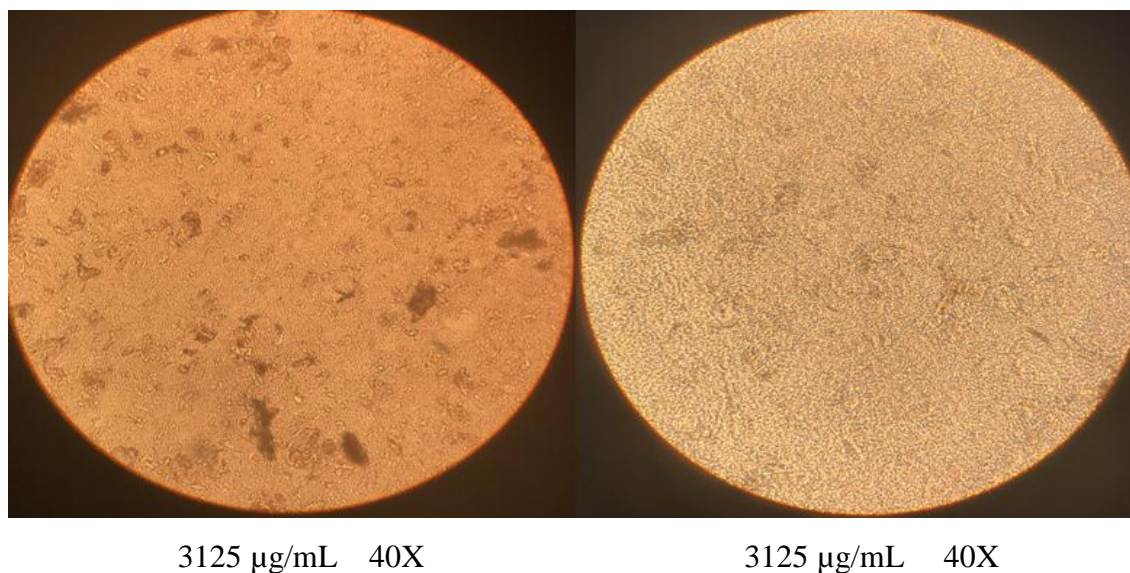


Figura 44. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 3125 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 3125 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

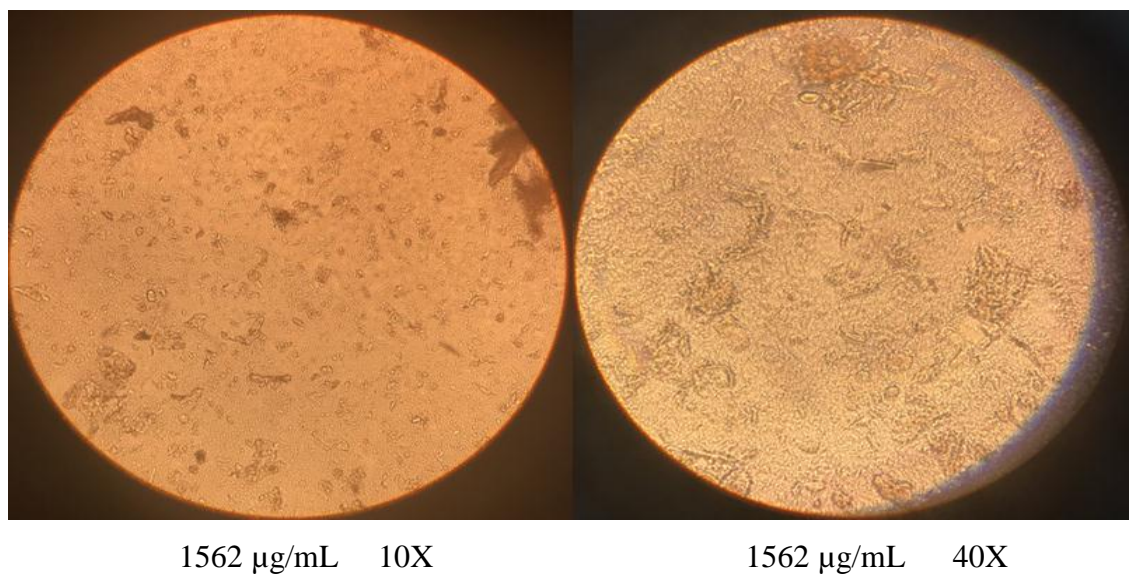


Figura 45. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 1562 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 1562 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

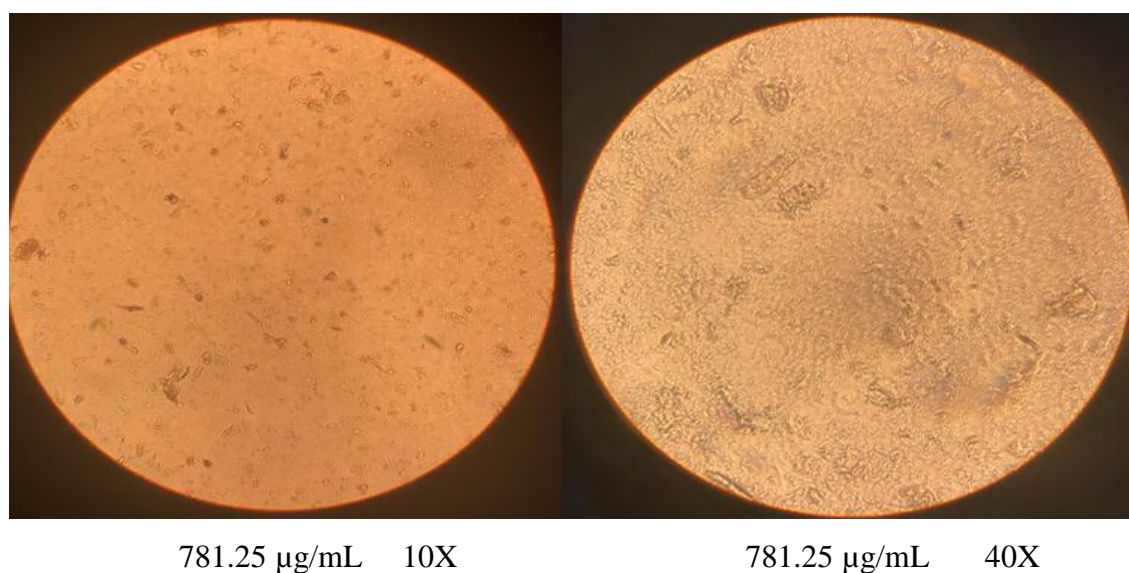


Figura 46. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 781.25 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 781.25 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

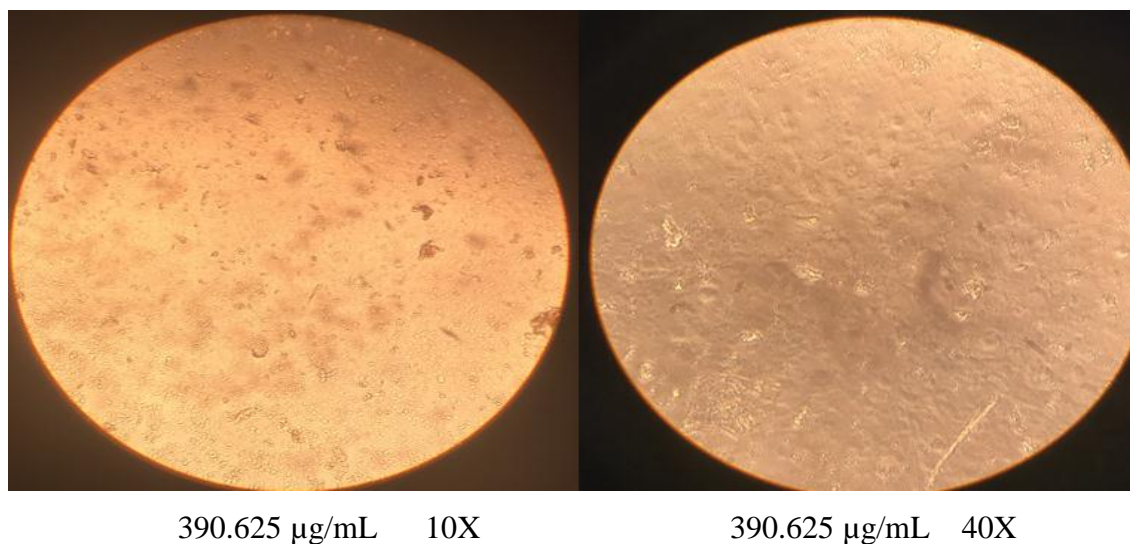


Figura 47. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 390.625 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 390.625 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

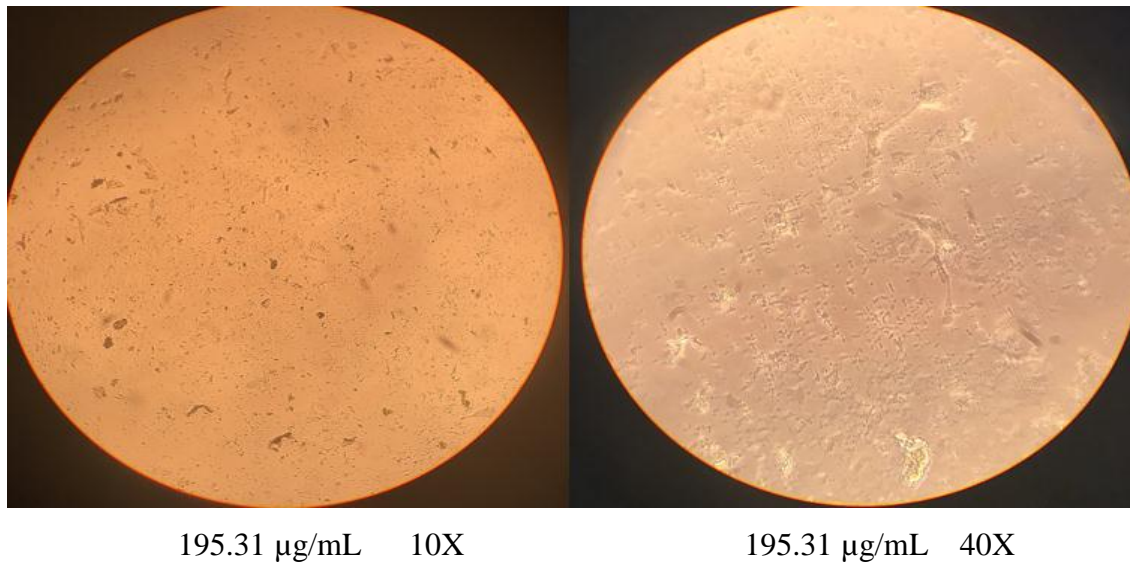


Figura 48. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 195.31 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 195.31 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

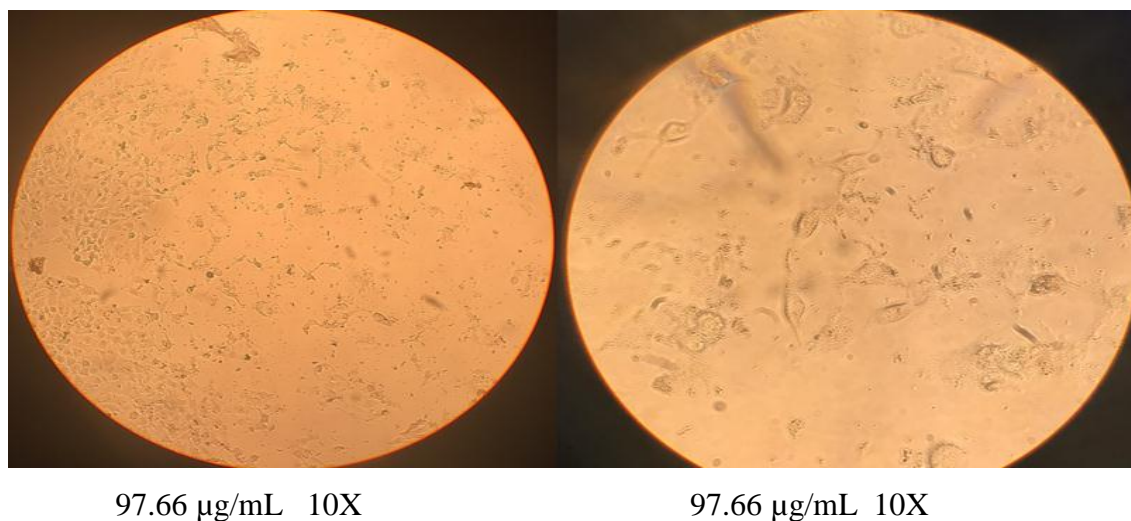


Figura 49. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 97.66 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 97.66 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

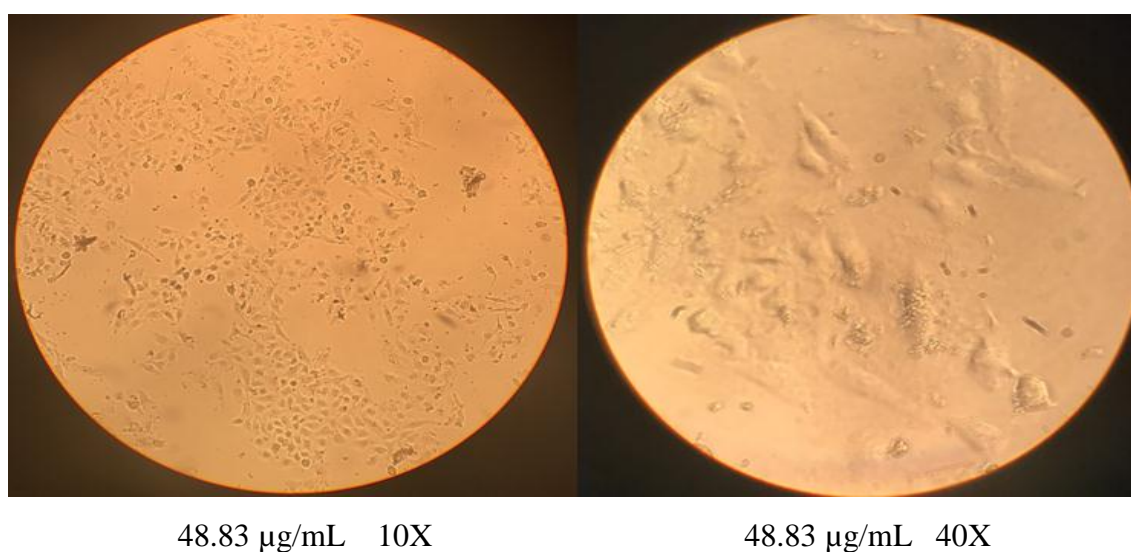


Figura 50. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 48.83 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 48.83 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

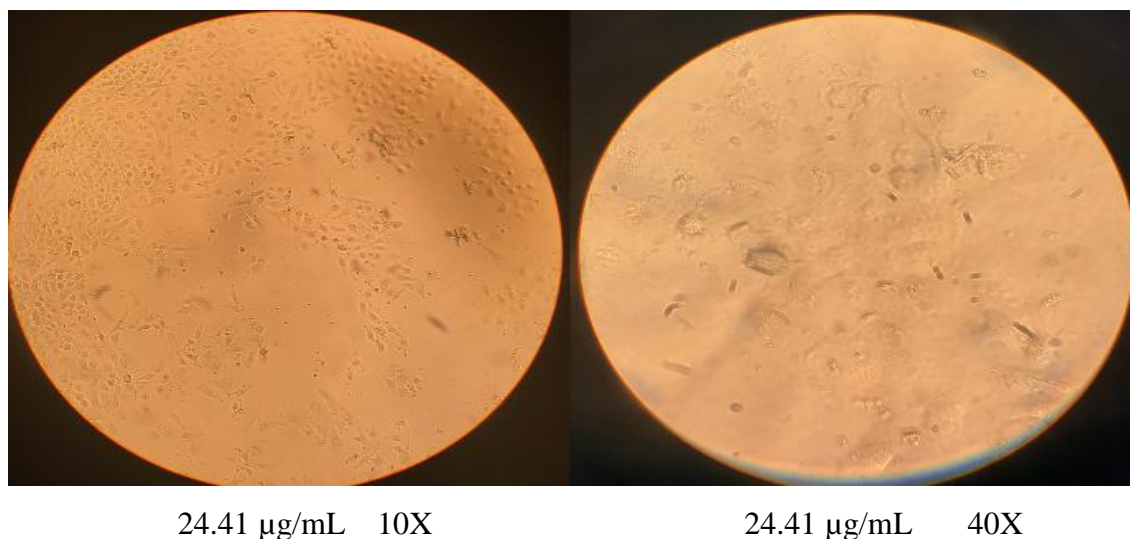


Figura 51. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 24.41 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 24.41 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

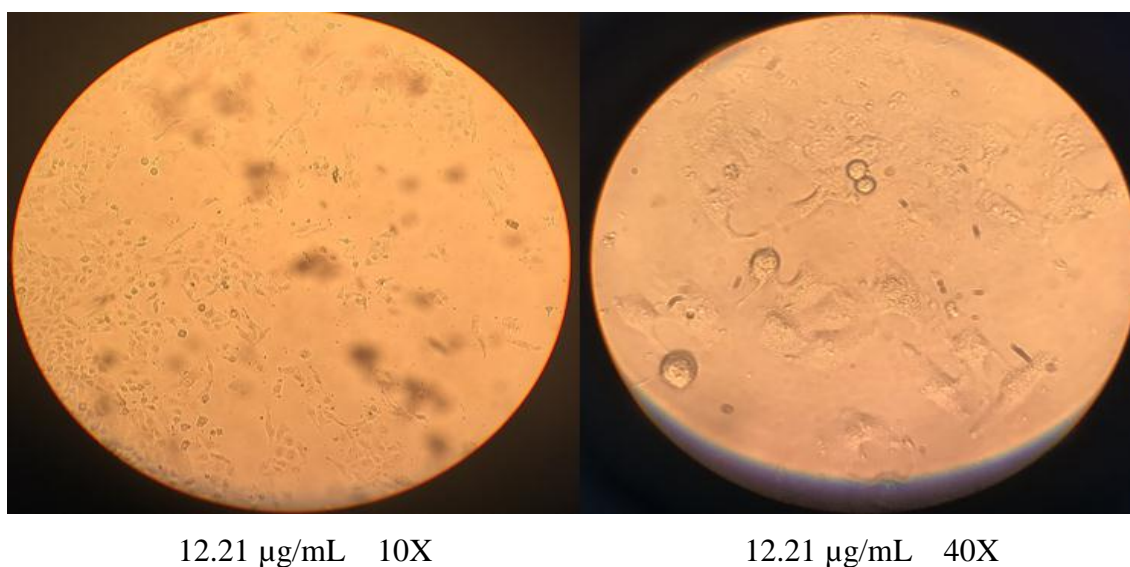


Figura 52. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 12.21 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 12.21 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

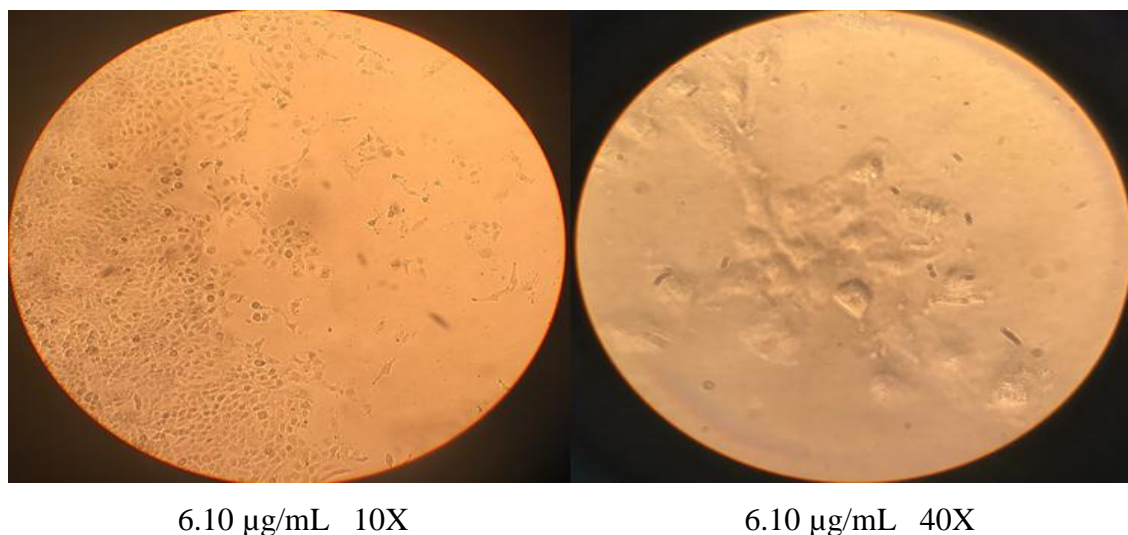


Figura 53. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 6.10 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 6.10 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

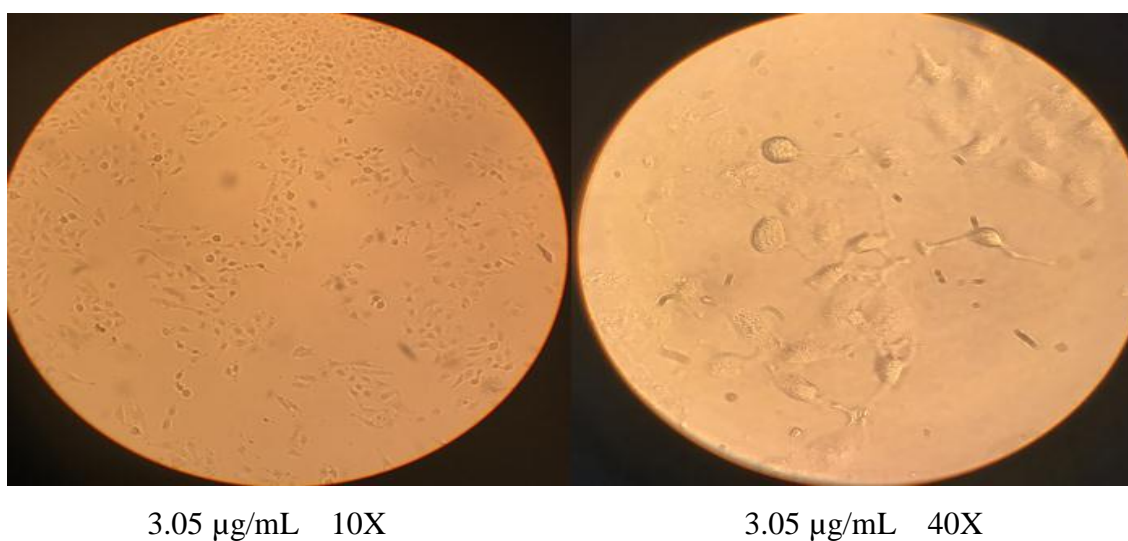
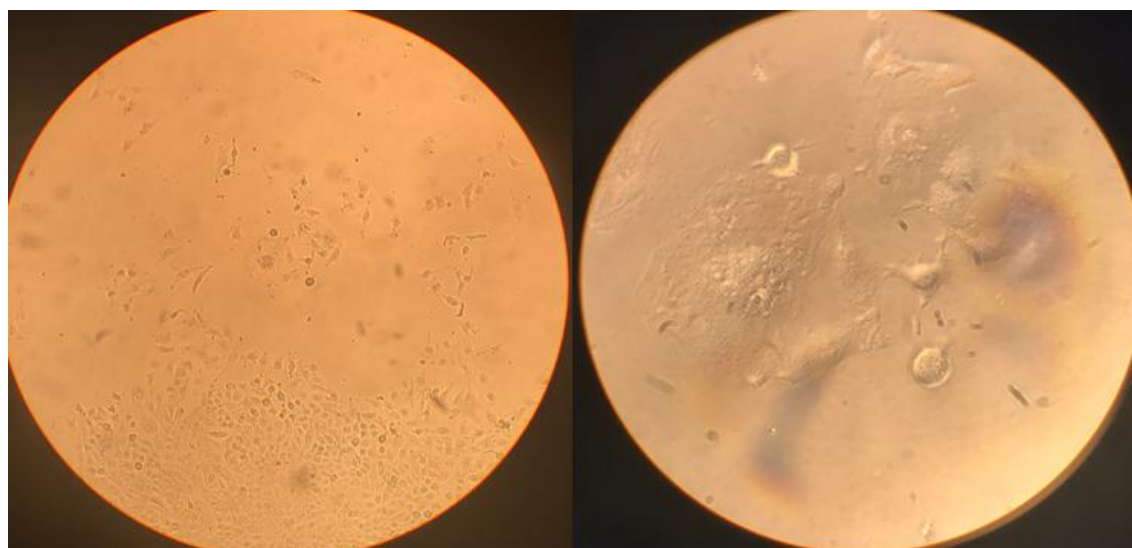


Figura 54. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 3.05 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 3.05 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.



1.53 µg/mL 10X

1.53 µg/mL 40X

Figura 55. Efecto de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* a la concentración 1.53 µg/mL sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón. Se observa el efecto de la secreción total a la concentración de 1.53 µg/mL después de 24 horas de iniciado el proceso de proliferación celular. Se observa con aumento de 10X y 40X.

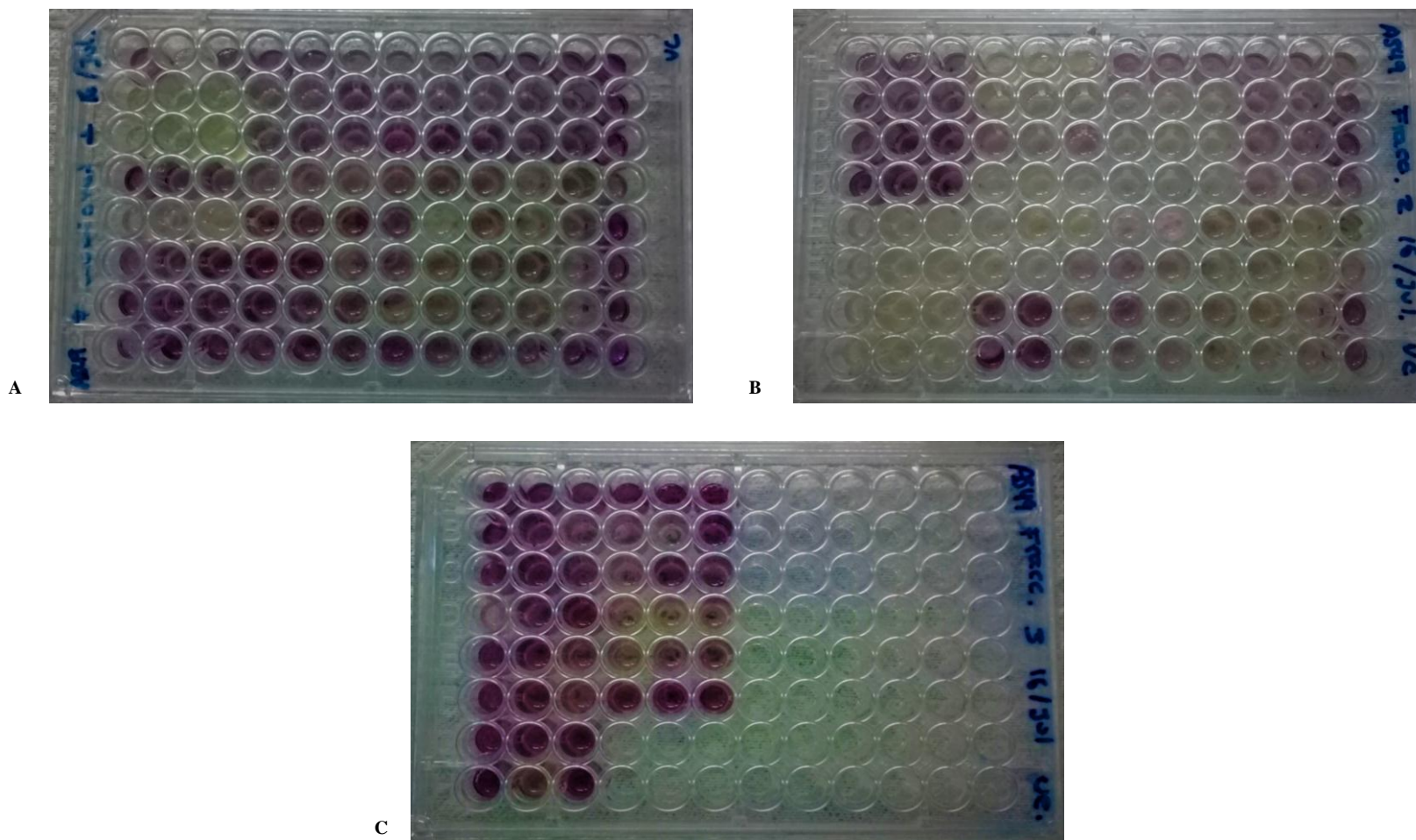


Figura 56. Actividad anticancerígena de las fracciones peptídicas de *Phyllomedusa tomopterna* mediante ensayos de citotoxicidad con MTT. A, ensayo de citotoxicidad de los controles y de la fracción 2 hasta la 28; B, ensayo de citotoxicidad de la fracción 29 hasta la 60; C, ensayo de citotoxicidad de la fracción 61 hasta la 74. Los pocillos teñidos de color morado muestran la inactividad de la secreción total y los pocillos transparentes muestran la actividad de la secreción total sobre la línea celular A549 ATCC® de cáncer de pulmón.

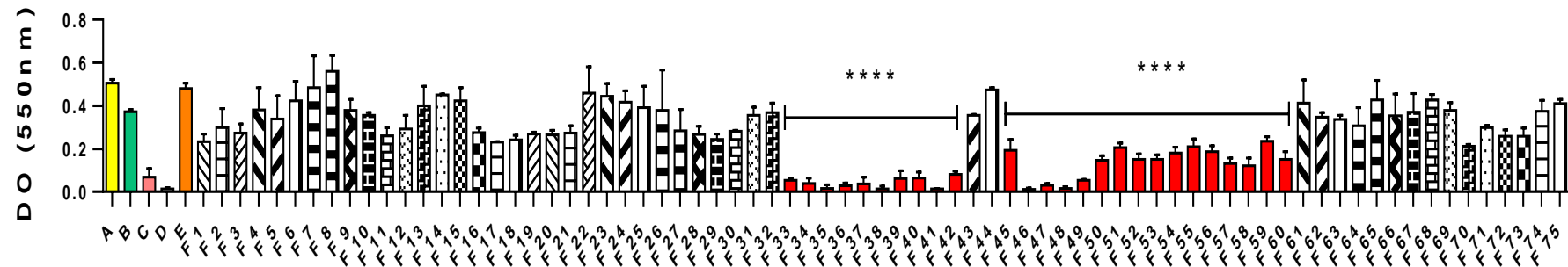


Figura 57. Citotoxicidad de las fracciones de *Phyllomedusa tomodopterna* frente a la línea celular A549 ATCC®, ensayo 5, se observa el total de las fracciones analizadas. A, células A549 ATCC ®; B, DMSO al 30%; C, Ácido acético al 1%; D, medio de cultivo; E, Solvente empleado en las fracciones. Las barras en blanco y negro representan a las fracciones sin actividad. En rojo, las fracciones que mostraron actividad.

****: $p < 0.0001$; ***: $p = 0.001$.

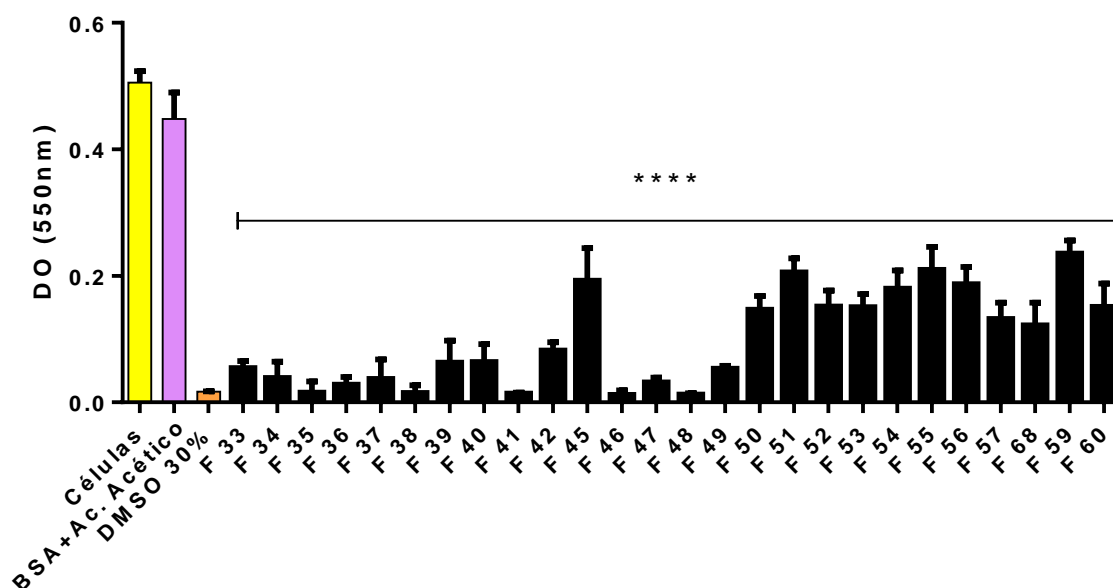


Figura 58. Citotoxicidad de las fracciones de *Phyllomedusa tomopterna* frente a la línea celular A549 ATCC®, ensayo 5, se observa las fracciones activas. La acción citotóxica se produce desde la fracción 33 hasta la fracción 42 y desde la fracción 45 hasta la fracción 60.

****: $p < 0.0001$.

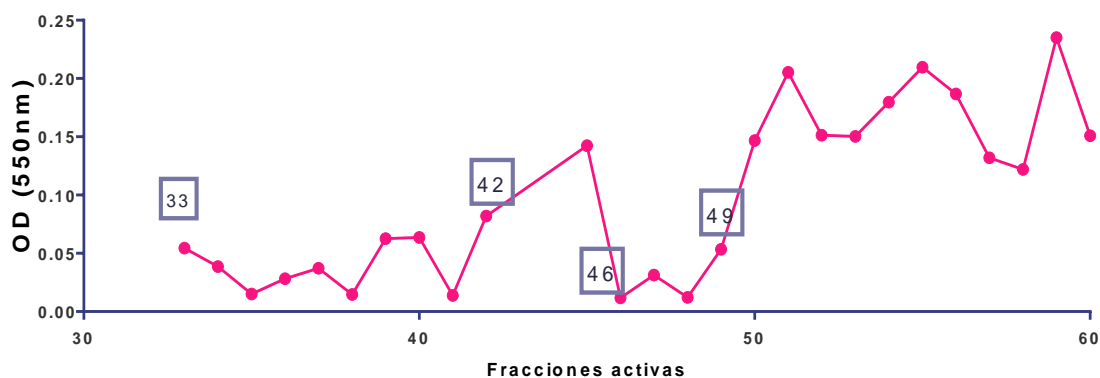
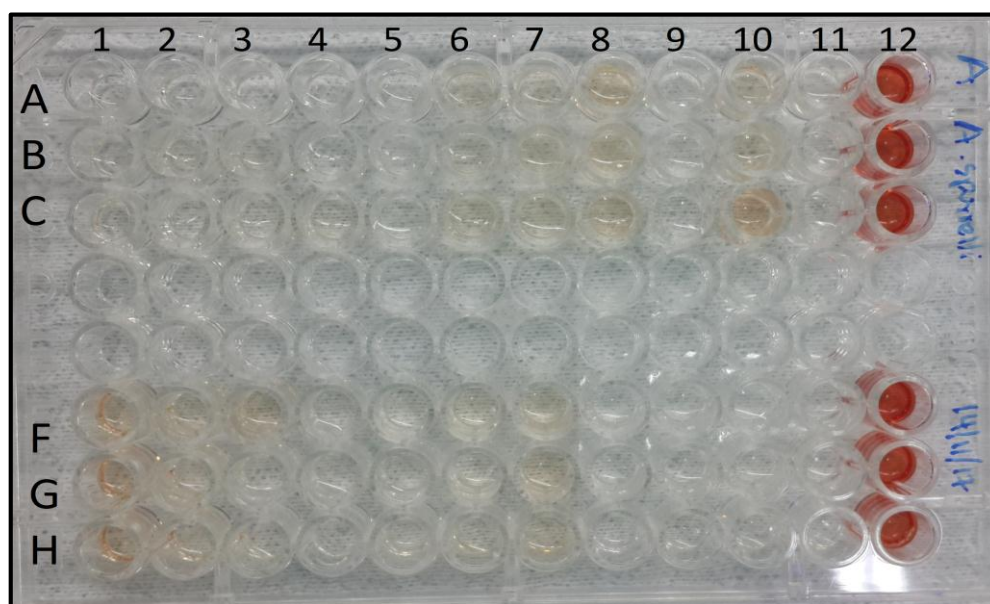


Figura 59. Curva de citotoxicidad, ensayo 5. En todas las fracciones se observa acción citotóxica, siendo mayor desde la fracción 33 hasta la fracción 42 y desde la fracción 45 hasta la fracción 60

A



B

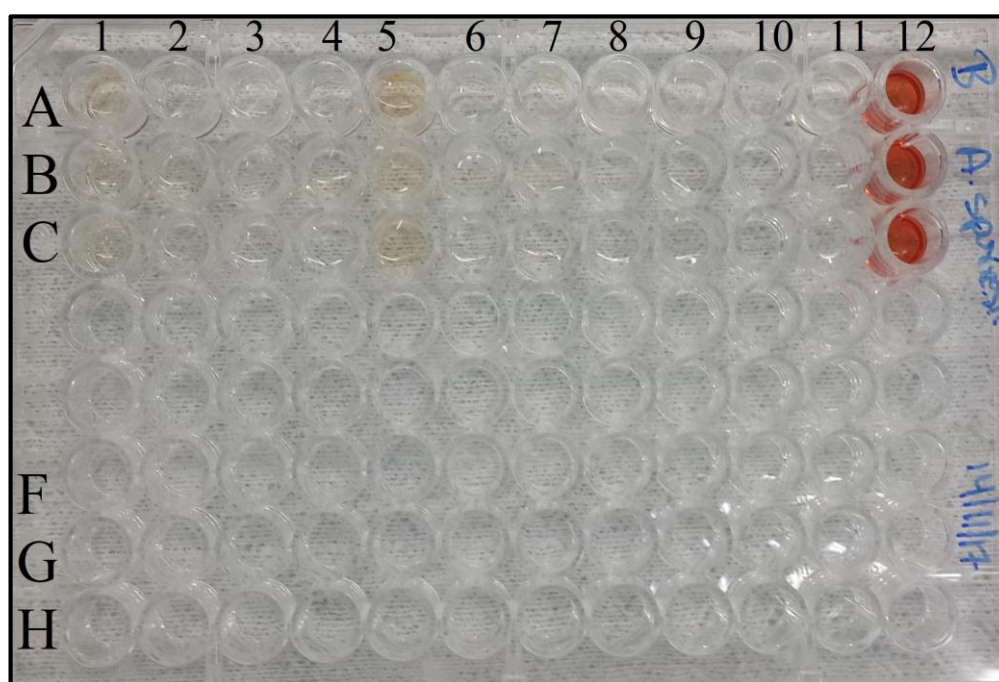


Figura 60. Grado de hemólisis de las fracciones de *Agalychnis spurrelli*. A, efecto hemolítico de la fracción 30 hasta la fracción 49 ; B, efecto hemolítico de la fracción 50 hasta la 55 y desde la 62 hasta la 64. En los pocillos # 11 se observa el control negativo de hemólisis y en los pocillos # 12 se observa el control positivo de hemólisis.

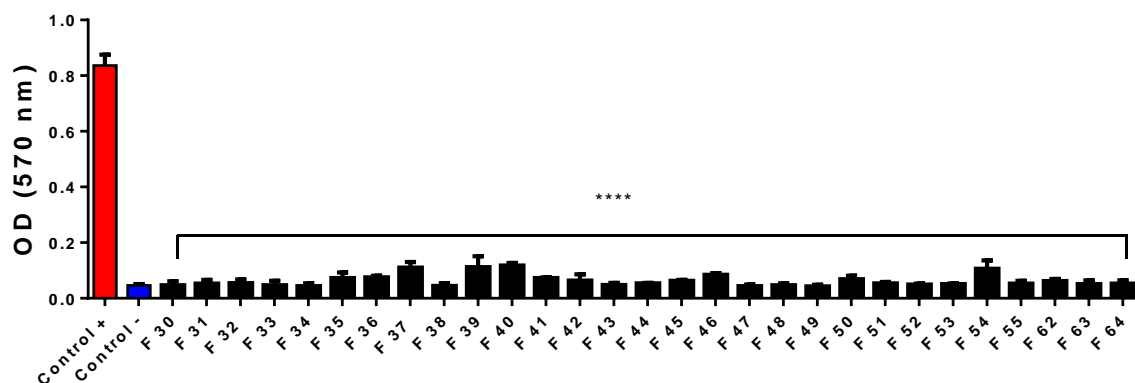


Figura 61. Prueba hemolítica de las fracciones activas de *Agalychnis spurrelli*. Las fracciones graficadas produjeron un efecto hemolítico mínimo ($DL < 50$).

Control +: 70 μ L glóbulos rojos 5% + 68.25 μ L de solución PBS y 1.75 μ L de Tritón X.

Control -: 70 μ L glóbulos rojos 5% + 70 μ L de solución PBS.

****: $p < 0.0001$.

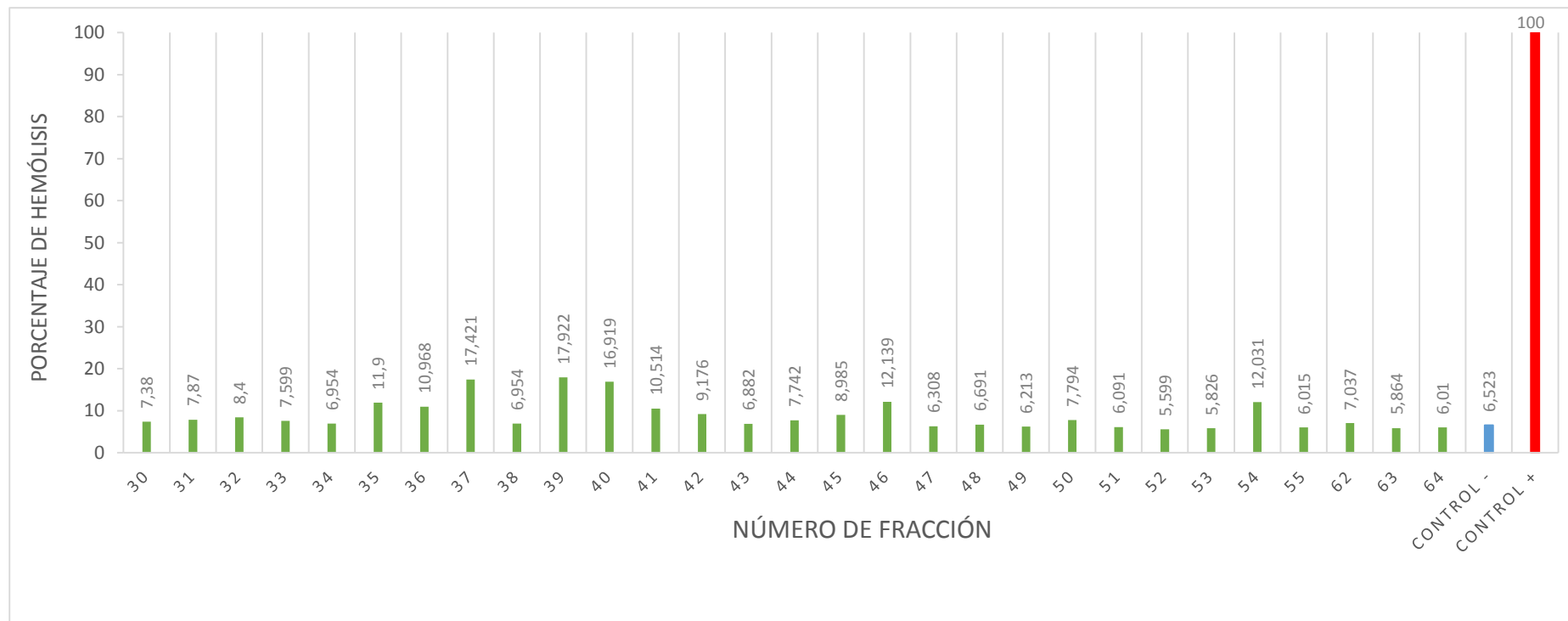
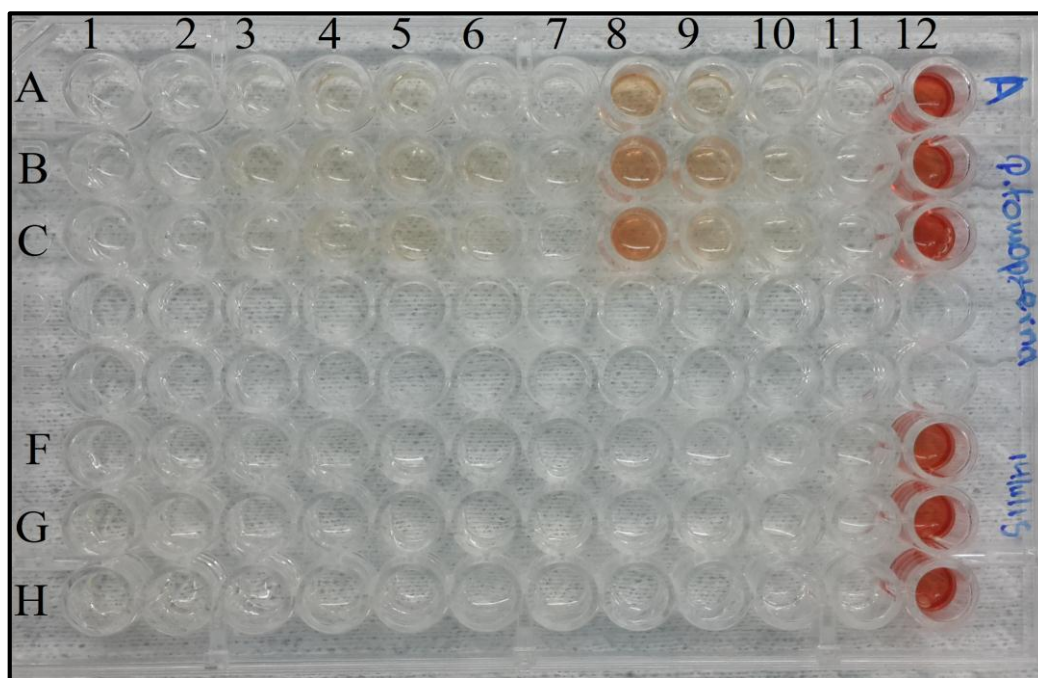


Figura 62. Porcentaje de hemólisis producida por las fracciones activas de *Agalychnis spurrelli*. Hemólisis producida por las fracciones 30 hasta la 64, control – y control +. Sobre cada barra se indica el porcentaje de hemólisis provocado por las respectivas fracciones.

A



B

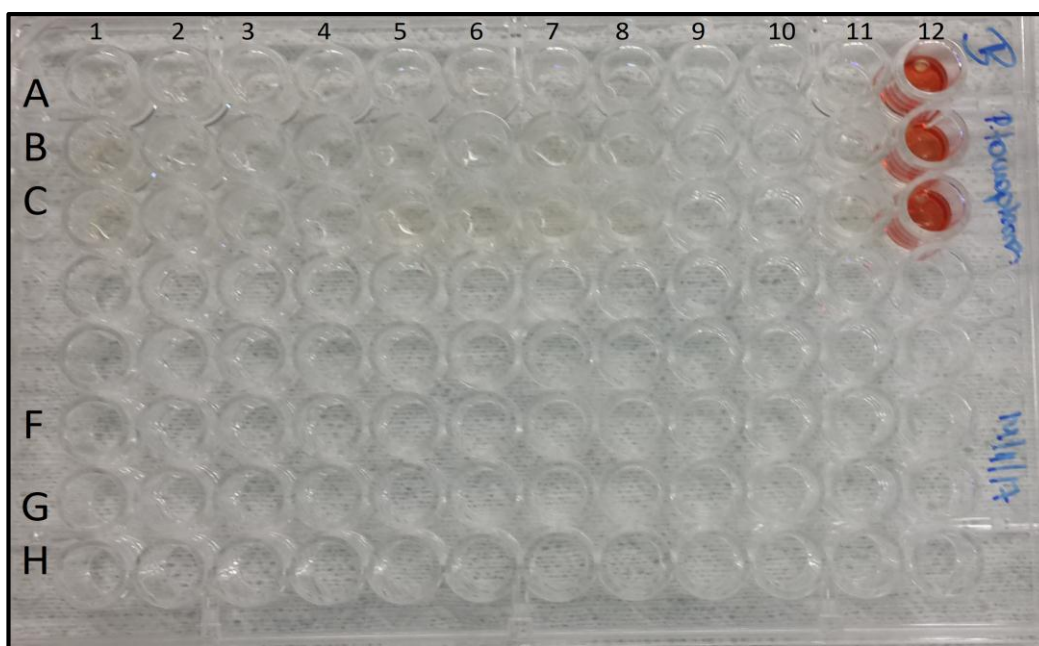


Figura 63. Grado de hemólisis de las fracciones de *Phyllomedusa tomopterna*. A, Hemólisis producida por las fracciones 33 a 42, control – y control +; B, Hemólisis producida por las fracciones 43 a 52, control – y control +. En los pocillos # 11 se observa el control negativo de hemólisis y en los pocillos # 12 se observa el control positivo de hemólisis.

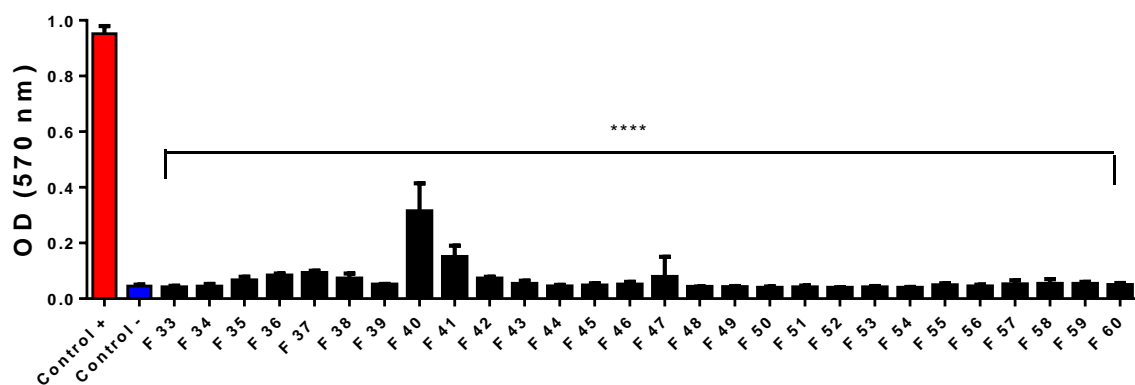


Figura 64. Prueba hemolítica de las fracciones activas de *Phyllomedusa tomopterna*.

Las fracciones graficadas produjeron un efecto hemolítico mínimo ($DL < 50$).

Control +: 70 μ L glóbulos rojos 5% + 68.25 μ L de solución PBS y 1.75 μ L de Tritón X.

Control -: 70 μ L glóbulos rojos 5% + 70 μ L de solución PBS.

****: $p < 0.0001$.

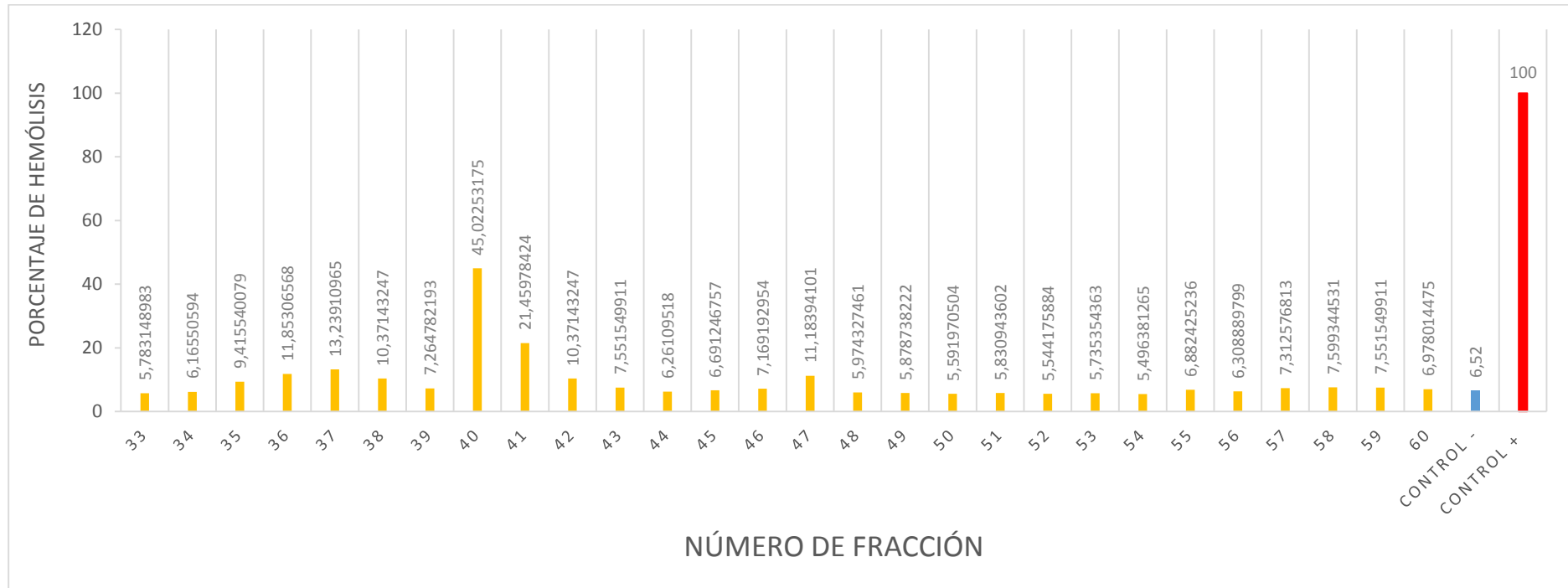


Figura 65. Porcentaje de hemólisis producida por las fracciones activas de *Agalychnis spurrelli*. Hemólisis producida por las fracciones 33 hasta la 42, control – y control +. Sobre cada barra se indica el porcentaje de hemólisis provocado por las respectivas fracciones.

11. TABLAS

Tabla 1. Lista de los individuos de *Agalychnis spurrelli* colectados en la provincia de Esmeraldas.

Ubicación	Serie de Campo	Nombre científico	Observación	Lugar de colección	Información ecológica
Balsa de los Sapos	SC57578	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57598	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57599	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57600	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57601	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57602	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57603	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57604	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57605	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57606	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57607	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57608	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57609	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57610	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57611	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme

Tabla 1. (Continuación) Lista de individuos de *Agalychnis spurrelli* colectados en la provincia de Esmeraldas.

Ubicación	Serie de Campo	Nombre científico	Observación	Lugar de colección	Información ecológica
Balsa de los Sapos	SC57612	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57613	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57614	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57615	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57616	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57617	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57618	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57619	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57620	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57621	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57622	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57623	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57624	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57625	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme
Balsa de los Sapos	SC57626	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	Bosque de tierra firme

Tabla 2. Lista de los individuos analizados de *Phyllomedusa tomopterna* de la Balsa de los Sapos en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Ubicación	Número de terrario	Nombre científico	Observación	Lugar de colección	Número de individuos
Balsa de los Sapos	T# 3779	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Esmeraldas	3
Balsa de los Sapos	T# 3398	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Pastaza	3
Balsa de los Sapos	T# 3346	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Pastaza	3
Balsa de los Sapos	T# 3395	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Colecta nocturna.	Ecuador. Provincia: Pastaza	1

Tabla 3. Lista de los individuos de *Agalychnis spurrelli* empleados en la muestra peptídica 1.

Serie de campo	Código LICBA	Fecha de extracción	Especie	Ubicación
T3771	QCAZ-BSA276	11/12/2015	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA533	22/05/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos

Tabla 4. Lista de los individuos de *Agalychnis spurrelli* empleados en la muestra peptídica 2.

Serie de campo	Código LICBA	Fecha de extracción	Especie	Ubicación
T4278	QCAZ-BSA501	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA502	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA503	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA504	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA505	19/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA506	19/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA507	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA508	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA509	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA510	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA511	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA513	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA514	19/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
SC26975	QCAZ-BSA515	05/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Bioterio CISEAI
SC26719	QCAZ-BSA516	01/09/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Bioterio CISEAI
SC26957	QCAZ-BSA517	09/2016	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Bioterio CISEAI
SC26973	QCAZ-BSA518	09/2016	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Bioterio CISEAI
SC15748	QCAZ-BSA519	09/2016	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Bioterio CISEAI
T3770	QCAZ-BSA520	30/08/2016	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA528	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos

Tabla 4. (Continuación) Lista de los individuos de *Agalychnis spurrelli* empleados en la muestra peptídica 2.

Serie de campo	Código LICBA	Fecha de extracción	Especie	Ubicación
T4278	QCAZ-BSA529	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA530	11/04/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA532	30/05/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA534	30/05/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA535	30/05/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA573	20/09/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA574	20/09/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA575	20/09/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4278	QCAZ-BSA576	20/09/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA577	26/09/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos
T4277	QCAZ-BSA578	26/09/2017	<i>Agalychnis spurrelli</i>	Balsa de los Sapos

Tabla 5. Lista de los individuos de *Phyllomedusa tomopterna* empleados en la muestra peptídica 3.

Serie de campo	Código LICBA	Fecha de extracción	Especie	Ubicación
T3398	QCAZ-BSA482	18/04/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA483	18/04/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA484	18/04/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA485	23/08/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA486	23/08/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA487	03/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
SC42975	QCAZ-BSA488	23/08/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Bioterio CISEal
T3779	QCAZ-BSA489	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3346	QCAZ-BSA490	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
SC42974	QCAZ-BSA491	03/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Bioterio CISEal
T3398	QCAZ-BSA492	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA493	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA494	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA495	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA496	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3346	QCAZ-BSA497	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
SC42975	QCAZ-BSA498	09/2016	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Bioterio CISEal
T3398	QCAZ-BSA521	07/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos

Tabla 5. (Continuación) Lista de los individuos de *Phyllomedusa tomopterna* empleados en la muestra peptídica 3.

Serie de campo	Código LICBA	Fecha de extracción	Especie	Ubicación
T3779	QCAZ-BSA524	07/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA523	07/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA522	07/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA525	07/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA526	07/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3346	QCAZ-BSA527	07/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3346	QCAZ-BSA536	29/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA537	29/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA538	29/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA539	29/05/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA579	17/09/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA580	17/09/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA581	17/09/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3398	QCAZ-BSA582	17/09/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3346	QCAZ-BSA583	17/09/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA584	25/09/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA585	17/09/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos
T3779	QCAZ-BSA586	23/08/2017	<i>Phyllomedusa tomopterna</i>	Balsa de los Sapos

Tabla 6. Registro de las extracciones y liofilizaciones de las secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna*.

QCAZ-Nemónico	Género	Especie	Número de campo / terrario	Fecha de extracción	Fecha de Liofilización	Peso en gramos	Responsable extracción
QCAZ-BSA488	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	SC42975	23/08/2016	24/08/2016	0,0260	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA491	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	SC42974	--/03/2017	--/03/2017	0,0114	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA482	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	18/04/2017	19/04/2017	0,0017	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA483	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	18/04/2017	19/04/2017	0,0042	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA484	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	18/04/2017	19/04/2017	0,0014	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA485	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	23/08/2016	24/08/2016	0,0074	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA486	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	23/08/2016	24/08/2016	0,0057	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA487	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	--/03/2017	--/03/2017	0,0071	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA481	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	18/04/2017	19/04/2017	0,0033	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA489	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	--/09/2016	--/09/2016	0,0070	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA490	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3346	--/09/2016	--/09/2016	0,0100	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA492	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	--/09/2016	--/09/2016	0,0047	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA493	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	--/09/2016	--/09/2016	0,0030	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA494	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	--/09/2016	--/09/2016	0,0158	Valeria Cajiao

Tabla 6. (Continuación...) Registro de las extracciones y liofilizaciones de las secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna*.

QCAZ-Nemónico	Género	Especie	Número de campo / terrario	Fecha de extracción	Fecha de Liofilización	Peso en gramos	Responsable extracción
QCAZ-BSA498	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	SC42975	--/09/2016	--/09/2016	0,0130	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA521	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	08/05/2017	09/05/2017	0,0171	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA522	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	08/05/2017	09/05/2017	0,0123	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA523	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	08/05/2017	09/05/2017	0,0185	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA495	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	--/09/2016	--/09/2016	0,0051	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA496	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	--/09/2016	--/09/2016	0,0063	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA497	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3346	--/09/2016	--/09/2016	0,0305	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA515	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	SC26975	04/04/2017	05/04/2017	0,0018	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA516	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	SC26719	01/09/2017	01/09/2017	0,0049	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA517	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	SC26957	--/09/2016	--/09/2016	0,0082	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA518	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	SC26973	--/09/2016	--/09/2016	0,0062	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA519	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	SC15748	--/09/2016	--/09/2016	0,0035	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA510	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	10/04/2017	11/04/2017	0,0134	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA511	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	10/04/2017	11/04/2017	0,0155	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA512	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0206	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA513	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0040	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA514	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	18/04/2017	19/04/2017	0,0028	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA520	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T3770	30/08/2016	30/08/2016	0,0060	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA499	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0060	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA500	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	10/04/2017	11/04/2017	0,0050	Valeria Cajiao

Tabla 6. (Continuación...) Registro de las extracciones y liofilizaciones de las secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna*.

QCAZ- Nemónico	Género	Especie	Número de campo / terrario	Fecha de extracción	Fecha de liofilización	Peso en gramos	Responsable extracción
QCAZ-BSA501	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0050	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA502	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	10/04/2017	11/04/2017	0,0219	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA503	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0072	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA504	<i>Agalychnis</i>	<i>Spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0154	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA505	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	18/04/2017	19/04/2017	0,0296	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA506	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	18/04/2017	19/04/2017	0,0005	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA507	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	10/04/2017	11/04/2017	0,0137	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA508	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	10/04/2017	11/04/2017	0,0202	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA524	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	08/05/2017	09/05/2017	0,0185	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA525	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	08/05/2017	09/05/2017	0,0122	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA526	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	08/05/2017	09/05/2017	0,0107	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA527	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3346	08/05/2017	09/05/2017	0,0060	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA528	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0061	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA529	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0125	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA530	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0167	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA531	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	10/04/2017	11/04/2017	0,0163	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA532	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	22/05/2017	30/05/2017	0,0495	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA533	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	22/05/2017	30/05/2017	0,0105	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA534	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	22/05/2017	30/05/2017	0,0229	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA535	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	22/05/2017	30/05/2017	0,0033	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA536	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3346	22/05/2017	30/05/2017	0,0012	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA537	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	22/05/2017	30/05/2017	0,0230	Valeria Cajiao

Tabla 6. (Continuación) Registro de las extracciones y liofilizaciones de las secreciones cutáneas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna*.

QCAZ-Nemónico	Género	Especie	Número de campo / terrario	Fecha de extracción	Fecha de liofilización	Peso en gramos	Responsable extracción
QCAZ-BSA539	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	22/05/2017	30/05/2017	0,0228	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA573	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	19/09/2017	20/09/2017	0,0377	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA574	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	19/09/2017	20/09/2017	0,0135	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA575	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	19/09/2017	20/09/2017	0,0235	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA576	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	19/09/2017	20/09/2017	0,0482	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA577	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	25/09/2017	26/09/2017	0,0172	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA578	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	25/09/2017	26/09/2017	0,0523	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA579	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	17/09/2017	18/09/2017	0,0385	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA580	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	17/09/2017	18/09/2017	0,0087	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA581	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	17/09/2017	18/09/2017	0,0312	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA582	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3398	17/09/2017	18/09/2017	0,0099	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA583	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3346	17/09/2017	18/09/2017	0,0054	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA538	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	22/05/2017	30/05/2017	0,0029	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA584	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	25/09/2017	26/09/2017	0,0130	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA585	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	17/09/2017	18/09/2017	0,0147	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA586	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	23/08/2017	24/08/2017	0,0057	Valeria Cajiao
QCAZ-BSA602	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4278	21/11/2017	28/11/2017	0,0042	Jaime Gavidia y Sofia Loor
QCAZ-BSA603	<i>Agalychnis</i>	<i>spurrelli</i>	T4277	21/11/2017	28/11/2017	0,0046	Jaime Gavidia y Sofia Loor
QCAZ-BSA604	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3346	21/11/2017	28/11/2017	0,0052	Jaime Gavidia y Sofia Loor
QCAZ-BSA605	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	21/11/2017	28/11/2017	0,0105	Jaime Gavidia y Sofia Loor
QCAZ-BSA606	<i>Phyllomedusa</i>	<i>tomopterna</i>	T3779	21/11/2017	28/11/2017	0,0205	Jaime Gavidia y Sofia Loor

Tabla 7. Bioactividad de las fracciones peptídicas de la muestra 1 de *Agalychnis spurrelli* sobre cepas bacterianas ATCC®. Se listan las fracciones activas contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Código LICBA	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	Corrida	Fracción	Desviación Estándar	% Inhibición	Bioactividad	Corrida	Fracción	Desviación Estándar	% Inhibición	Bioactividad
C-1	1	35	0,01501111	92,1262635	Bacteriostática	1	32	0,0011547	81,9186653	Bacterioestática
C-1	1	36	0,01951922	85,635751	Bactericida	1	33	0,00057735	82,6068822	Bactericida
C-1	1	37	0,01530795	88,0829934	Bactericida	1	34	0,00378594	83,1699687	Bactericida
C-1	1	38	0,03780212	76,059585	Bactericida	1	35	0,00057735	82,7945777	Bactericida
C-1	1	39	0,03567913	75,1019684	Bactericida	1	36	0,03524675	88,362878	Bactericida
C-1	1	40	0,01915724	87,8701897	Bactericida	1	37	0,00550757	83,4827946	Bactericida
C-1	1	41	0,02688866	90,1046285	Bactericida	1	38	0,00353500	100	Bactericida
C-1	1	42	0,02124611	100	Bactericida	1	39	0,01040833	84,6089677	Bactericida
C-1	1	43	0,01571623	91,0622451	Bactericida	1	40	0,00208167	82,6068822	Bactericida
C-1	1	46	0,01992486	87,2317787	Bacteriostática	1	41	0,00251661	82,919708	Bactericida
C-1	1	47	0,01955335	87,6573861	Bacteriostática	1	42	0,00992321	100	Bactericida
C-1	1	48	0,02971532	82,7629012	Bactericida	1	43	0,01266228	100	Bactericida
C-1	1	49	0,02262742	88,8278063	Bactericida	1	44	0,00766000	81,9186653	Bacterioestática
C-1	1	50	0,02751771	69,6754744	Bacteriostática	1	45	0,00208167	82,3566215	Bacterioestática
C-1	1	51	0,02223361	99,3615889	Bacteriostática	1	46	0,00070711	83,1386861	Bactericida
C-1	1	52	0,01171893	97,978365	Bacteriostática	1	47	0,00200000	94,9947862	Bactericida
						1	48	0,00057735	82,919708	Bactericida
						1	49	0,00321455	82,544317	Bactericida

Cl: muestra 1

Tabla 8. Bioactividad de las fracciones peptídicas de la muestra 2 de *Agalychnis spurrelli* sobre cepas bacterianas ATCC®. Se listan las fracciones activas contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Código LICBA	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	Corrida	Fracción	Desviación Estándar	% Inhibición	Bioactividad	Corrida	Fracción	Desviación Estándar	% Inhibición	Bioactividad
C-2	1	35	0,00230222	92,514885	Bacterioestática	1	31	0,01879601	100	Bacterioestática
C-2	1	36	0,00415153	95,197516	Bactericida	1	32	0,04368737	96,5956963	Bactericida
C-2	1	37	0,00613694	72,558151	Bactericida	1	34	0,01266228	99,9642127	Bactericida
C-2	1	39	0,00565685	95,035179	Bactericida	1	35	0,0187735	98,4904864	Bactericida
C-2	1	40	0,01001665	85,619594	Bactericida	1	36	0,01165549	100	Bactericida
C-2	1	41	0,00832666	92,437776	Bactericida	1	37	0,016383656	100	Bactericida
C-2	1	42	0,01250001	93,608634	Bactericida	1	38	0,01442221	100	Bactericida
C-2	1	43	0,02545584	93,411802	Bactericida	1	39	0,00983381	96,4319492	Bactericida
C-2	1	44	0,01975686	87,567646	Bactericida	1	40	0,01266228	98,911551	Bactericida
C-2	1	45	0,02957837	83,928571	Bactericida	1	41	0,01631745	98,2331697	Bactericida
C-2	1	46	0,0011547	81,588198	Bactericida	1	42	0,02030964	100	Bactericida
C-2	1	50	0,01692139	88,216997	Bactericida	1	43	0,02668957	97,0518495	Bactericida
						1	44	0,02381995	92,2096081	Bacterioestática
						1	45	0,01646542	97,1571156	Bacterioestática
						1	46	0,04285246	97,92906708	Bactericida
						1	47	0,04879037	85,2269558	Bactericida
						1	54	0,04879037	85,2269558	Bactericida
						1	63	0,01116348	95,0412667	Bactericida

C 2: muestra 2

Tabla 9. Bioactividad de las fracciones peptídicas de la muestra 3 de *Phyllomedusa tomopterna* sobre cepas bacterianas ATCC®. Se listan las fracciones activas contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Código LICBA	<i>Staphylococcus aureus</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	Corrida	Fracción	Desviación Estándar	% Inhibición	Bioactividad	Corrida	Fracción	Desviación Estándar	% Inhibición	Bioactividad
C 3	1	35	0,002	87,5532631	Bactericida	1	5	0,00107031	83,4513716	Bactericida
C 3	1	36	0,00351188	88,0017941	Bactericida	1	20	0,00645316	84,4678304	Bactericida
C 3	1	37	0,0011547	87,6653958	Bactericida	1	31	0,01043213	82,1463342	Bactericida
C 3	1	38	0,00152753	87,7775286	Bactericida	1	32	0,00506337	88,0478803	Bactericida
C 3	1	39	0,00866025	89,5716528	Bactericida	1	33	0,00740968	100	Bactericida
C 3	1	40	0,00141421	91,8143081	Bactericida	1	34	0,01050397	100	Bactericida
C 3	1	41	0,00051316	89,4258802	Bactericida	1	35	0,01561805	100	Bactericida
C 3	1	42	0,00136504	86,2861628	Bacteriostático	1	36	0,00948325	100	Bactericida
C 3	1	43	0,00162635	92,3861852	Bacteriostático	1	37	0,00492577	100	Bactericida
C 3	1	46	0,00195533	89,5155865	Bacteriostático	1	38	0,01124807	100	Bactericida
C 3	1	47	0,00152753	89,6837856	Bactericida	1	39	0,00849961	100	Bactericida
C 3		48	0,00017321	89,1006952	Bactericida	1	40	0,01322876	100	Bacteriostático
C 3		49	0,00620726	83,4892768	Bacteriostático	1	41	0,01417745	100	Bacteriostático
						1	42	0,009	100	Bacteriostático
						1	43	0,00092916	100	Bactericida
						1	46	0,00896456	100	Bactericida
						1	47	0,02577466	100	Bactericida
						1	48	0,02253886	100	Bactericida
						1	49	0,01004658	82,9226933	Bacteriostático

C 3: muestra 3

Tabla 10. Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* en las muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*.

# de fracción	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	Control -	Control +
% hemólisis	7,38426874	7,886112	8,387956	7,599345	6,954117	11,90086	10,96887	17,42114	6,954117	17,92298	6,523849	100

Tabla 10. (Continuación...) Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*.

# de fracción	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	Control -	Control +
% hemólisis	16,9192954	10,51482	9,176567	6,882425	7,742728	8,985389	12,13983	6,30889	6,691247	6,213301	6,523849	100

Tabla 10. (Continuación) Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Agalychnis spurrelli* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*.

# de fracción	50	51	52	53	54	55	62	63	64	Control -	Control +
% hemólisis	7,79417329	6,091563	5,599697	5,826712	12,03178	6,015891	7,037457	5,864548	6,015891	6,523849	100

Tabla 11. Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*

# de fracción	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	Control -	Control +
% hemólisis	5,783149	6,165506	9,41554	11,85307	13,23911	10,37143	7,264782	45,02253	21,45978	10,37143	6,52	100

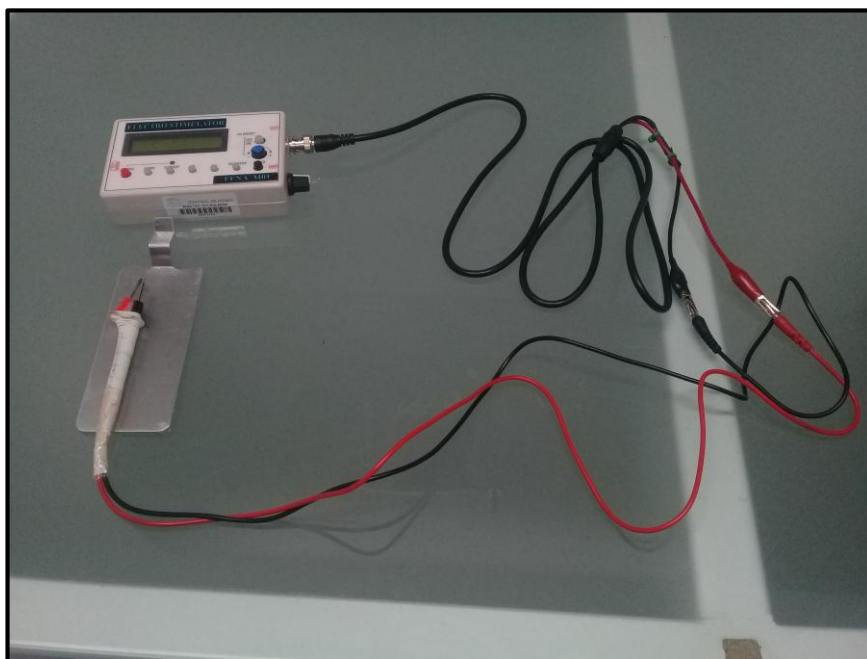
Tabla 11. (Continuación...) Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*

# de fracción	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	Control -	Control +
% hemólisis	7,55155	6,261095	6,691247	7,169193	11,18394	5,974327	5,878738	5,591971	5,830944	5,544176	6,52	100

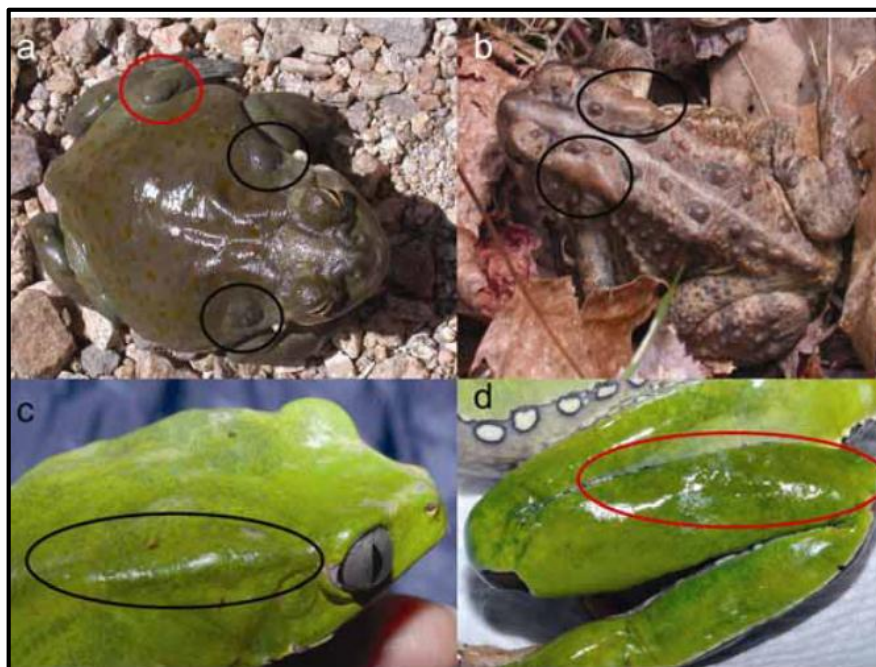
Tabla 11. (Continuación) Porcentaje de hemólisis de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna* en muestras de sangre desfibrinada de *Equus ferus caballus*

# de fracción	53	54	55	56	57	58	59	60	Control -	Control +
% hemólisis	5,735354	5,496381	6,882425	6,30889	7,312577	7,599345	7,55155	6,978014	6,52	100

12. ANEXOS



Anexo 1. Estimulador transcutáneo de anfibios (Transcutaneous Amphibian Stimulator -TAS).



Anexo 2. Método manual de extracción de las secreciones peptídicas o estimulación mecánica. Se estimula a las glándulas parótidas de los individuos a estudiar mediante masajes. Imagen tomada de Clark, 2009. Foto: Valerie C. Clark.

Current Recipe: C:\Wirtis\peptidos6.rcw Values loaded from disk file

Recipe Number 6

Extraccion

F2 Synoptic
F3 PC Save
F4 Print
F7 Write
F8 Read

Thermal Treatment

	Temp	Time	R/H
Step 1	10	20	H
Step 2	-40	240	R
Step 3	-40	30	H
Step 4	0	0	
Step 5	0	0	
Step 6	0	0	
Step 7	0	0	
Step 8	0	0	
Step 9	0	0	
Step 10	0	0	
Step 11	0	0	
Step 12	0	0	

Freeze -40
Extra Freeze 15
Condenser -50
Vacuum 500

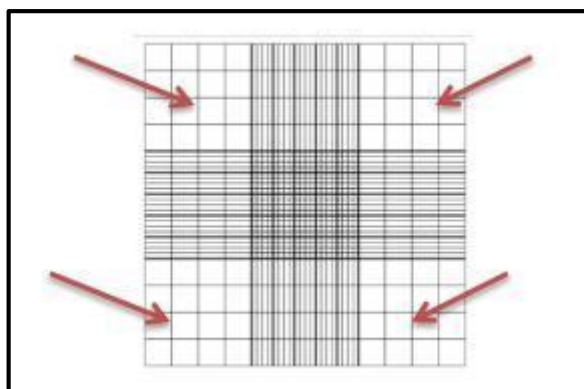
Secondary SP 20

Primary Drying

	Temp	Time	Vacuum	R/H
Step 1	-40	30	100	H
Step 2	-10	300	100	R
Step 3	-10	20	100	H
Step 4	20	300	100	R
Step 5	20	10	100	H
Step 6	0	0	0	
Step 7	0	0	0	
Step 8	0	0	0	
Step 9	0	0	0	
Step 10	0	0	0	
Step 11	0	0	0	
Step 12	0	0	0	
Step 13	0	0	0	
Step 14	0	0	0	
Step 15	0	0	0	
Step 16	0	0	0	

Post Ht 20 30 500

Anexo 3. Detalles del proceso de liofilización de las secreciones cutáneas. Se observan los pasos involucrados en el proceso de liofilización. Tomado de Dillón, 2012.



Anexo 4: Representación gráfica de la cámara de Neubauer. Los 4 cuadrantes señalados son los utilizados para realizar el conteo de las células animales (MIT, 2010).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				As µg/mL			Pt µg/mL			
			LPS	50	25	12,5	100	50	25	
C	Células	DMSO	50ul	40,48	20,241	10,12	46,05	23,02	11,5	Medio
D	Células	DMSO	50ul	40,48	20,241	10,12	46,05	23,02	11,5	Medio
E	Células	DMSO								Medio

Anexo 5. Plan de placa empleado en los ensayos de citotoxicidad 1 y 2. As, *Agalychnis spurrelli*; Pt, *Phyllomedusa tomopterna*; LPS, lipopolisacárido; DMSO, dimetil sulfóxido.

	1	2	3	4	5	6
A	Células	Células	Células	B 100 mg/mL	B 100 mg/mL	B 100 mg/mL
B	DMSO	DMSO	DMSO	B 50 mg/mL	B 50 mg/mL	B 50 mg/mL
C	Tritón X 1%	Tritón X 1%	Tritón X 1%	B 25 mg/mL	B 25 mg/mL	B 25 mg/mL
D	Ácido acético 1%	Ácido acético 1%	Ácido acético 1%	Medio	Medio	Medio
E	Metanol 30%	Metanol 30%	Metanol 30%			
F	A 50 mg/mL	A 50 mg/mL	A 50 mg/mL			
G	A 25 mg/mL	A 25 mg/mL	A 25 mg/mL			
H	A 12,5 mg/mL	A 12,5 mg/mL	A 12,5 mg/mL			

Anexo 6. Plan de placas empleado en el ensayo de citotoxicidad 3. A, *Agalychnis spurrelli*; B, *Phyllomedusa tomopterna*; DMSO, dimetil sulfóxido 20%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Células	Células	Células	A 97.66 µg/mL	A 97.66 µg/mL	A 97.66 µg/mL	B 6.25 µg/mL	B 6.25 µg/mL	B 6.25 µg/mL	B 24.41 µg/mL	B 24.41 µg/mL	B 24.41 µg/mL
B	BSA+ácido acético	BSA+ácido acético	BSA+ácido acético	A 48.83 µg/mL	A 48.83 µg/mL	A 48.83 µg/mL	B 3.125 µg/mL	B 3.125 µg/mL	B 3.125 µg/mL	B 12.21 µg/mL	B 12.21 µg/mL	B 12.21 µg/mL
C	Ácido acético 1%	Ácido acético 1%	Ácido acético 1%	A 24.41 µg/mL	A 24.41 µg/mL	A 24.41 µg/mL	B 1.562 µg/mL	B 1.562 µg/mL	B 1.562 µg/mL	B 6.10 µg/mL	B 6.10 µg/mL	B 6.10 µg/mL
D	A 3125 µg/mL	A 3125 µg/mL	A 3125 µg/mL	A 12.21 µg/mL	A 12.21 µg/mL	A 12.21 µg/mL	B 781.25 µg/mL	B 781.25 µg/mL	B 781.25 µg/mL	B 3.05 µg/mL	B 3.05 µg/mL	B 3.05 µg/mL
E	A 1562 µg/mL	A 1562 µg/mL	A 1562 µg/mL	A 6.10 µg/mL	A 6.10 µg/mL	A 6.10 µg/mL	B 390.63 µg/mL	B 390.63 µg/mL	B 390.63 µg/mL	B 1.53 µg/mL	B 1.53 µg/mL	B 1.53 µg/mL
F	781.25 µg/mL	781.25 µg/mL	781.25 µg/mL	A 3.05 µg/mL	A 3.05 µg/mL	A 3.05 µg/mL	B 195.31 µg/mL	B 195.31 µg/mL	B 195.31 µg/mL			
G	A 390.625 µg/mL	A 390.625 µg/mL	A 390.625 µg/mL	A 1.53 µg/mL	A 1.53 µg/mL	A 1.53 µg/mL	B 97.66 µg/mL	B 97.66 µg/mL	B 97.66 µg/mL			
H	A 195.31 µg/mL	A 195.31 µg/mL	A 195.31 µg/mL	Medio	Medio	Medio	B 48.83 µg/mL	B 48.83 µg/mL	B 48.83 µg/mL			

Anexo 7. Plan de placas empleado en el ensayo de citotoxicidad 4. A, *Agalychnis spurrelli*; B, *Phyllomedusa tomopterna*; BSA, albúmina de suero bovino.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CELULAS	CELULAS	CELULAS	F5	F5	F5	F13	F13	F13	F21	F21	F21
B	DMSO	DMSO	DMSO	F6	F6	F6	F14	F14	F14	F22	F22	F22
C	Ácido Acético	Ácido Acético	Ácido Acético	F7	F7	F7	F15	F15	F15	F23	F23	F23
D	Solvente	Solvente	Solvente	F8	F8	F8	F16	F16	F16	F24	F24	F24
E	Medio	Medio	Medio	F9	F9	F9	F17	F17	F17	F25	F25	F25
F	F2	F2	F2	F10	F10	F10	F18	F18	F18	F26	F26	F26
G	F3	F3	F3	F11	F11	F11	F19	F19	F19	F27	F27	F27
H	F4	F4	F4	F12	F12	F12	F20	F20	F20	F28	F28	F28

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F29	F29	F29	F37	F37	F37	F45	F45	F45	F53	F53	F53
B	F30	F30	F30	F38	F38	F38	F46	F46	F46	F54	F54	F54
C	F31	F31	F31	F39	F39	F39	F47	F47	F47	F55	F55	F55
D	F32	F32	F32	F40	F40	F40	F48	F48	F48	F56	F56	F56
E	F33	F33	F33	F41	F41	F41	F49	F49	F49	F57	F57	F57
F	F34	F34	F34	F42	F42	F42	F50	F50	F50	F58	F58	F58
G	F35	F35	F35	F43	F43	F43	F51	F51	F51	F59	F59	F59
H	F36	F36	F36	F44	F44	F44	F52	F52	F52	F60	F60	F60

C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	F61	F61	F61	F69	F69	F69						
B	F62	F62	F62	F70	F70	F70						
C	F63	F63	F63	F71	F71	F71						
D	F64	F64	F64	F72	F72	F72						
E	F65	F65	F65	F73	F73	F73						
F	F66	F66	F66	F74	F74	F74						
G	F67	F67	F67									
H	F68	F68	F68									

Anexo 8. Plan de placas empleado en el ensayo de citotoxicidad con fracciones de la secreción cutánea total de *Phyllomedusa tomopterna*, ensayo 5. A, Plan de placa de los controles empleados y de las fracciones 2 hasta la 28; B, Plan de placa de las fracciones 29 hasta la 60; C, Plan de placa de las fracciones 61 hasta la 74.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	control -	control +
B	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	control -	control +
C	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	control -	control +
D												
E												
F	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	control -	control +
G	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	control -	control +
H	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	control -	control +

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50	51	52	53	54	55	62	63	64		control -	control +
B	50	51	52	53	54	55	62	63	64		control -	control +
C	50	51	52	53	54	55	62	63	64		control -	control +
D												
E												
F												
G												
H												

Anexo 9. Plan de placa de la prueba de hemólisis de las fracciones obtenidas de *Agalychnis spurrelli*. A, plan de placa de los controles y de las fracciones 30 hasta la 49; B, plan de placa de los controles y de las fracciones 50 hasta la 64.

Control +: 70 µL glóbulos rojos 5% + 68.25 µL de solución PBS y 1.75 µL de Tritón X.

Control -: 70 µL glóbulos rojos 5% + 70 µL de solución PBS.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	control -	control +
B	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	control -	control +
C	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	control -	control +
D												
E												
F	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	control -	control +
G	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	control -	control +
H	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	control -	control +

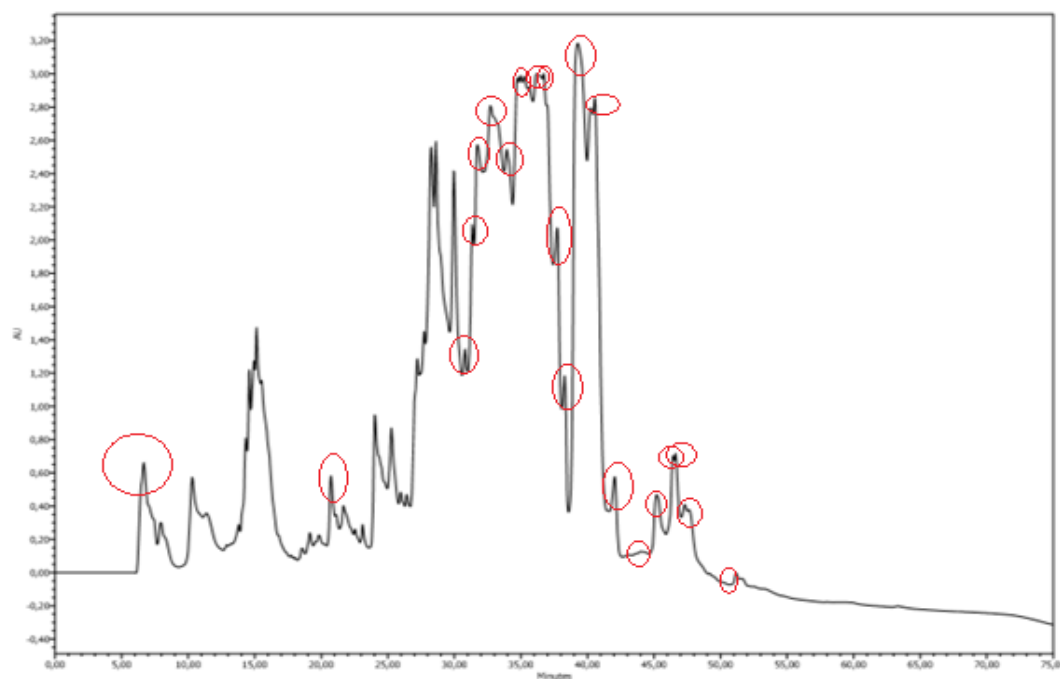
B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	43	44	55	56	57	58	59	60			control -	control +
B	43	44	55	56	57	58	59	60			control -	control +
C	43	44	55	56	57	58	59	60			control -	control +
D												
E												
F												
G												
H												

Anexo 10. Plan de placa de la prueba de hemólisis de las fracciones obtenidas de *Phyllomedusa tomopterna*. A, plan de placa de los controles y de las fracciones 33 hasta la 42; B, plan de placa de los controles y de las fracciones 43, 44, 55 hasta la 60.

Control +: 70 μ L glóbulos rojos 5% + 68.25 μ L de solución PBS y 1.75 μ L de Tritón X.

Control -: 70 μ L glóbulos rojos 5% + 70 μ L de solución PBS.



Anexo 11. Cromatograma de *Phyllomedusa tomopterna* al realizar una corrida con una columna defectuosa. Se observan picos poco definidos como resultado de usar una columna desgastada.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Valeria Liseth Cajiao Garcés, con C.I. 1726593468 autora del trabajo de graduación titulado: “Bioactividad de fracciones peptídicas de *Agalychnis spurrelli* y *Phyllomedusa tomopterna* (Anura: Hylidae)”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 05 de noviembre del 2018